# Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen an Extrakten aus Collum uteri und Collum-Carcinom

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Michael Austgen

Saarbrücken

1972

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Universitäts-Frauenklinik Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. H. Limburg

---

# Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen an Extrakten aus Collum uteri und Collum-Carcinom.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Michael Austgen

Dekan: Prof. Dr. med. H. Kulenkampff

Referent: Priv. Doz. Dr. med. G. Loskant

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 24.2.1972 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS


Seite

I. Einleitung 1

II. Untersuchungen von Gewebeproteinen 2

1. Löslichkeit der Gewebeproteine 2

2. Methoden der Proteingewinnung 6

3. Elektrophoretische Untersuchungen von Gewebeeiweißen 8

4. Bisherige Untersuchungen der Uterusmuskulatur 11

a) Proteine des Uterus und ihre Gewinnung 11

b) elektrophoretische Untersuchungen des Uterus 14

5. Fraktionierung der Gewebe mit Hilfe der Ultrazentrifugation 17

III. Eigene Untersuchungen 19

A Methodik 19

1. Material und Vorbereitung 19

a) normales Collum uteri 19

b) Collum-Carcinom 20

2. Vorversuche und Eiweißbestimmung 21

3. Hauptuntersuchungsgang 31

a) Extraktion, Homogenisation, Zentrifugation 31

Seite


b) Dialyse 31

c) Lyophilisierung und Einengung 32

d) Ultrazentrifugation 33

e) Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese 40

4. Auswertung 44

a) Spektographie 44

b) Statistik 45

B Untersuchungsergebnisse 46

a) der Gesamtextrakte 46

b) der Ultrazentrifugation 50

IV. Diskussion 54

V. Zusammenfassung 60

VI. Literaturverzeichnis 62

## I. EINLEITUNG

Das Studium qualitativer und quantitativer Veränderungen der Proteine durch pathologische Prozesse der Gewebe, setzt eine schonende und ergiebige Extraktionsmethode der Gewebsproteine voraus. Dieses Problem stellte sich uns bei Untersuchungen am Collum uteri und seinem Carcinom. Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt - von den vorhandenen Erkenntnissen der Gewebeaufarbeitung ausgehend - eine Methode zu finden, die erlaubt Gesamtextrakte aus Collum uteri und Collum-Carcinom sowie definierte Ultrazentrifugensedimente herzustellen. Erste elektrophoretische Untersuchungen des Materials sollen die Brauchbarkeit der gefundenen Extraktionsmethode und des Trennungsganges demonstrieren. Da das Problem der Extraktion von Gewebsproteinen und der präparativen Ultrazentrifugation zahlreiche Einwände erlaubt, sollen die angewandten Methoden immer wieder im Rahmen der in der Literatur gefundenen Erkenntnisse diskutiert werden.

## II. Untersuchungen von Gewebeproteinen

### 1. Löslichkeit der Gewebeproteine

Grundlegend für die Untersuchungen von Gewebeeiweißen sind die Art der Aufarbeitung und besonders das Lösungsmittel, da letzteres die Proteine möglichst vollständig extrahieren und wenig schädigen oder gar denaturieren soll. Die meisten Proteine bilden in der Natur komplexe Assoziate mit anderen Substanzen - z. B. in Form von Fasern, Membranen und Mitochondrien - und liegen so als funktionell einheitliche Bestandteile der lebenden Zelle nie rein und isoliert vor; außerdem sind sie meist mit Lipiden, Kohlehydraten, Nucleinsäuren, anderen organischen Stoffen und verschiedenen anorganischen Ionen vergesellschaftet und bilden mit diesen zusammen kolloidale Lösungen (MEIENHOFER et al., 1960 (73). Da die Proteine gegen mechanische und chemische Einflüsse sehr empfindlich sind, wird das native Protein - einmal aus seinem natürlichen Milieu entfernt - sehr schnell verändert; dies geschieht einerseits durch die Spaltung covalenter Bindungen = Abbau (Spaltung von Ammoniak aus Säureamidgruppen, Spaltung von Peptid- und Disulfidbindungen, Hydrolyse, Oxydation oder Reduktion, Veränderungen der Seitenketten und Abspaltung proteinfremder prosthetischer Gruppen), andererseits durch Denaturierung = Koagulation, durch Veränderungen des Molekulargewichtes, der spez. Drehung, des isoelektrischen Punktes und der biologischen

Aktivität. Als Ursache dieser Proteinveränderungen kommt eine Vielzahl von teils physikalischen Einwirkungen wie Hitze, mechanische Kräfte (Einfrieren, Druck, Zermahlen und Schallwellen), energiereiche Strahlung und teils chemische Agentien, wie Reduktions- oder Oxydationsmittel, proteolytische Enzyme, anorganische Elektrolyte und organische Lösungsmittel in Betracht. (DOMAGK et al., 1968 (28), MEIENHOFER et al., 1960 (73). Da bereits Temperaturerhöhungen um wenige Grade denaturierend wirken können, muß man alle Versuche bei tiefen Temperaturen, am besten um $0^{\circ}C$, durchführen.

Die Löslichkeit der Proteine wird hauptsächlich von fünf Faktoren beeinflußt (LANG et al., 1955 (56), MEIENHOFER et al., 1960 (73) und SOBER et al., 1965 (102):

1. Temperatur
2. Ionenstärke (Salze)
3. Dielektrizitätskonstante (organische Lösungsmittel, dipolare Ionen)
4. pH (Säuren, Basen)
5. Proteinkonzentration

Normalerweise wird die Löslichkeit der Proteine durch eine Temperaturerhöhung in verdünnten Salzlösungen erhöht und in konzentrierten Salzlösungen erniedrigt. Doch gibt es für die Temperaturabhängigkeit keine allgemein gültige Regel, denn auch in verdünnten Salzlösungen bzw. in Wasser zeigen einige Proteine (z. B. Plasmaalbuminsulfat und Insu-

linsulfat) einen negativen, dagegen andere auch in konzentrierten Salzlösungen einen positiven Temperaturkoeffizienten. Viele Eiweiße, die in reinem Wasser schwer oder völlig unlöslich sind, lösen sich bei Anwesenheit geringer Mengen neutraler Salze, da ihre Löslichkeit durch Wechselwirkung der Ionen mit den polaren Gruppen des Eiweißmoleküls erhöht wird ("Einsalzeffekt" = "salting in"); ab einem gewissen Ionenmaximum jedoch fällt die Löslichkeit wieder ab ("Aussalzeffekt" = "salting out"). Aber auch dies ist kein allgemein gültiges Gesetz, denn es gibt nun wieder Proteine, die nur in Wasser löslich sind, andere wiederum nur in konzentrierten Salzlösungen. Durch eine Erhöhung der Dielektrizitätskonstante der Lösung können auch dipolare Ionen die Proteinlöslichkeit erhöhen. Von größter Bedeutung für die Löslichkeit von Eiweißen ist der pH-Wert; am isoelektrischen Punkt befindet sich ein Löslichkeitsmaximum, das so eng umgrenzt ist, daß bereits eine nur geringe pH-Verschiebung eine große Änderung der Proteinlöslichkeit mit sich bringen kann. Durch Zugabe kleiner Salzmengen wird die Löslichkeit infolge des Einsalzeffektes im gesamten pH-Bereich erhöht. Dagegen begünstigen hohe Salzkonzentrationen infolge des Aussalzeffektes die Ausfällung von Proteinen. Dabei sind die Salze mehrwertiger Anionen wirksamer als die einwertiger, und die Salze mehrwertiger Kationen weniger wirksam als die einwertiger. Genau umgekehrt verhält es sich beim Einsalzeffekt. Durch Veränderung dieser genannten Bedingungen ist es möglich bestimmte Proteine zu lösen oder

auszufällen.

Organische Lösungsmittel wie Alkohol, Aceton etc. erniedrigen die Dielektrizitätskonstante, vermindern die Hydration der Proteine und setzen dadurch die Löslichkeit der Eiweiße herab; daher sind diese auch allgemein zur Extraktion von Gewebeeiweißen nicht geeignet. Da man die Eiweiße möglichst schonend in Lösung bringen will, werden Skleroproteine nicht extrahiert (MEIENHOFER et al., 1960 (73).

Es ist daher zu erwarten, daß man nicht mit einem Verfahren alle Proteine extrahieren kann, sondern jeweils nur die Gewebeeiweiße gelöst werden können, die in diesem einen speziellen Extraktionsmedium mit genau definiertem pH und gleicher Ionenstärke in Lösung gehen; daher muß man, will man Gewebeproteine miteinander vergleichen, bei allen Versuchen diese Bedingungen stets konstant einhalten.

Aus obigen Ausführungen resultiert für uns, daß den in dieser Arbeit zur Extraktion der Gewebeeiweiße des Uterus benutzten Methoden, sehr enge Grenzen gesteckt sind und folglich auch die Ergebnisse weiterführender Analysen nur auf der angeführten methodischen Grundlage diskutiert werden dürfen.

## 2. Methoden der Proteingewinnung

Da Extraktion und Isolierung von Gewebeeiweißen von den oben beschriebenen Faktoren abhängen, ist es verständlich, daß in der Literatur eine kaum überschaubare Anzahl von "Rezepten" zur Extraktion löslicher Eiweiße wie auch unlöslicher Skleroproteine angegeben ist, die verschiedentlich durch ungenaue Angaben über pH-Bereich oder Ionenstärke noch mannigfaltiger und verwirrender werden. Insgesamt gesehen richtet sich die Methodik jeweils nach den speziellen Fragestellungen bzw. nach den Eigenheiten der zu untersuchenden Gewebe. So benutzt eine große Anzahl von Autoren Pufferlösungen zur Proteinextraktion; dabei bevorzugen CIOFFI et al., 1964 (15) zur Isolierung von Proteinen aus dem Herz- und Skelettmuskel des Kalbes, JAKOB, 1947 (57) zur Proteinanalyse der quergestreiften Kaninchenmuskulatur und LOHMAN, 1962 (66) zur elektrophoretischen Untersuchung der Gefäßintima den Veronalpuffer. Andere Autoren dagegen wie CREPAX et al., 1950 (17) zur Gewinnung von Muskeleiweißen, DEMLING et al., 1955 (25-27) zur elektrophoretischen Untersuchung der verschiedensten Organe wie Herz, Leber, Lunge, Niere und Uterus, ERNST, 1967 (34) zur Untersuchung von Extrakten dystrophischer Muskeln und NIKILLA et al., 1955 (79) zur Proteinanalyse der Fischmuskulatur verwandten Phosphat- bzw. Karbonatpuffer in unterschiedlichen Zusammensetzungen und mit verschiedenen pH-Werten.

Andere Autoren wie GÖTZ et al., 1963 (37, 38), HAFERKAMP,

1964 (41), KAPLAN et al., 1962 (60) und MELVIN et al., 1962 (74) bevorzugen Salzlösungen zur Extraktion der verschiedenen Organeiweiße. LOWENTHAL et al., 1964 (69) lösten Harneiweiße in isotoner Saccharoselösung, MOORE et al., 1965 (76) dagegen extrahierten Proteine aus Gehirn und Leber in aqua dest.und trennten sie mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese. PERLMANN et al., 1958 (82) lösten Mitochondrieneiweiße in 0,4 %igen Desoxycholat und ROBERT et al., 1963 (88) schließlich extrahierten Kollagen und Elastin aus dem Ochsenherzen mittels Kalilauge, Äthanol und Aceton.

OTT, et al., 1958 (81) untersuchten die Proteine der Aortenintima und van SANDE et al., 1959 (91) die des Prostata-Carcinoms; beide Untersucher verzichteten völlig auf eine Extraktion und führten ihre Gewebe nach Homogenisation mit Seesand und Zentrifugation direkt der Elektrophorese zu.

Andere Autoren stellten große Vergleichsuntersuchungen zwischen enzelnen Proteinlösungsmitteln an; so verglichen BERENSON et al., 1962 (7) an der Ochsenaorta aqua dest., NaCl sowie 0,15 M und 0,3 M Saccharose miteinander, wobei sie mit aqua dest. nur etwa halb so viel Protein lösen konnten wie mit den übrigen Extraktionsmedien. BOSCH, 1951 (11) fand mit Kalium- bzw. Natrium-Phosphatpuffer einzeln oder in Verbindung mit 0,5 M KCl und mit beiden zusammen in Verbindung mit 0,05 M KCl am Kaninchenmuskel insgesamt 9 Eiweißkomponenten, die sich bei Stei-

gerung der Ionenstärke nicht änderten. SHULMAN et al., 1966 (99) wiederum fanden keine wesentlichen quantitativen Unterschiede bei ihren vergleichenden Untersuchungen von NaCl, 0,1 M bzw. 0,2 M Natriumphosphatpuffer, aqua dest. und Saccharose als Extraktionsmedien der Skelettmuskeleiweiße von Patienten mit Myasthenia gravis.

## 3. Elektrophoretische Untersuchungen der Gewebeeiweiße

Während die elektrophoretische Untersuchung von Körperflüssigkeiten, speziell die des Blutes, schon seit langem zu den Routineuntersuchungen in der Klinik gehört, wurden die Gewebeproteine erst in letzter Zeit intensiv erforscht und selbst heute noch ist die Untersuchung der Organeiweiße mit manchen Problemen verbunden, wie oben beschrieben wurde. Darüber hinaus scheint es unmöglich, ein Organ völlig zu entbluten, so daß die im Serum vorhandenen Proteine im Gewebe verbleiben und so das spezifische Eiweißbild des Organs verfälschen.

Mit der elektrophoretischen Untersuchung von Muskelproteinen haben sich vor allem AMBERSON et al., 1949 (3) und DUBUISSON et al., 1945 (51) befaßt. Dabei fand AMBERSON typische Diagramme mit Myogen-, Myosin- und Myoglobulinkomponenten, während DUBUISSON im Kaninchenmuskel eine $\alpha$ - (25%), $\beta$ - (70%) und $\gamma$ - Komponente (5%) nachwies; von diesen waren die $\alpha$ - und $\gamma$ - Komponente bei Ermüdung bis zum Verschwinden vermindert.

AFONSO, 1963 (1) erreichte bei seinen Untersuchungen über verschiedene Tumore eine gute Trennung der einzelnen Fraktionen von Gewebeeiweißen mit Hilfe der Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese und konnte bei einigen Tumoren (Fibrosarkom und Plattenepithel-Carcinom) typische Fraktionsverteilungen feststellen.

ALLEGRANZA et al., 1961 (2) trennten die Proteine verschiedener Hirnareale in der Agarelektrophorese und fanden in der grauen und weißen Substanz 9, im Hirnstamm 11 und im Kleinhirn 12 Eiweißfraktionen; in allen Pherogrammen war Praealbumin enthalten.

DEMLING et al., 1952 (25-27) und HENNING et al., 1953 (44) sahen ein Hauptproblem in der vollständigen Entblutung der Organe. Sie spülten die verschiedensten Gewebe und Tumoren nach Entblutung und Zerreibung in einer "Organmühle" so lange mit Ringerlösung bis kein Hämoglobin mehr nachweisbar war. Nach Überschichtung des Homogenates mit Phosphatpuffer untersuchten sie die Organeiweiße mit Hilfe der Papierelektrophorese und fanden, daß die Proteine aus Organen und freien Blutzellen ähnlich schnell laufen wie die Serumproteine. Besonders fiel ihnen der relativ geringe Albumingehalt aller Organe und freien Zellen mit Ausnahme des Uterus und des lymphatischen Gewebes auf.

Auch KESSEL, 1960 (61) stieß bei seinen Untersuchungen über die Leber- und Nierenproteine in der Agarelektro-

phorese auf Schwierigkeiten, die seiner Meinung nach in den methodischen Fehlern der Organaufarbeitung lagen. Auch er fand nach Extraktion mit Veronal-Na-Puffer (pH = 8,6) in der Papier- und Immunelektrophorese einen Albuminmangel der Organe und schloß wegen der Übereinstimmung der Praezipitationslinien auf eine nur ungenügende Entblutung des Untersuchungsgutes.

MILLER et al., 1950 (75) führten vergleichende Versuche am Rhabdomyosarkom und normalem Muskelgewebe der Maus mit der freien Elektrophorese in der Tiseliusapparatur durch und fanden 7 Proteinkomponenten beim pathologisch veränderten und 3 beim normalen Muskelgewebe, die miteinander nicht identisch waren.

PLASS et al., 1966 (84) und SCHWENKE et al., 1966 (97, 98) führten vergleichende Untersuchungen an der Goldhamsterniere und Rattenleber sowie am Tumorgewebe dieser Organe mit Hilfe der freien und Stärkegelelektrophorese durch; dabei konnten sie 12 Proteinfraktionen der Rattenleber (davon 3 Praealbumine) sowie an der Goldhamsterniere 11 Eiweißkomponenten darstellen, die schneller als die Serumproteine wanderten. Beim Rattenhepatom war die Fraktion des Praealbumins$_3$ erhöht und die dem $\gamma$- entsprechende Komponente erniedrigt; beim Nieren-Carcinom des Goldhamsters fehlte die Fraktion $\gamma_3$.

RAPP et al., 1965 (85, 86) erforschten in vergleichenden Untersuchungen den Magensaft, die normale Magenschleimhaut und das Magen-Carcinom bis in ihre subcellulären

Strukturen hinein und überprüften ihren Proteingehalt; dabei fanden sie ein neues Enzym, ein Glykoproteid mit besonderen antigenen Eigenschaften, das im elektrophoretischen Bereich der β-1/ γ -G-Globuline wandert und in den Mitochondrien der Korpuszellen gebildet wird.

Eine umfassende Übersicht all' dieser Verfahren zur Gewinnung von Gewebeproteinen sowie ihren elektrophoretischen Untersuchungen und Ergebnissen stellte BACKHAUSZ, 1967 (4) zusammen.

## 4. Bisherige Untersuchungen der Uterusmuskulatur

### a) Proteine der Uterusmuskulatur und ihre Gewinnung

So vielfältig und verwirrend die Angaben zur Aufarbeitung der verschiedenen Gewebe auch sind, so liegt doch für den Uterus bzw. speziell für die Cervix uteri keine fertige Methode zur Gewebeaufarbeitung und Proteinextraktion vor.

Grundlegende Arbeiten über den Aufbau und Proteingehalt der Uterusmuskulatur verdanken wir CRETIUS et al., 1957-1967 (19, 22, 23). Nach ihren Untersuchungen ist der Gesamteiweißgehalt der Uterusmuskulatur niedriger, doch ihr Gehalt an Stromaeiweißen (66,8%) relativ höher als der der Skelettmuskulatur (23,7%); die wasserlöslichen Proteine machen zusammen 25,1% und die kontraktilen Eiweiße 6,7% des Gesamteiweißgehaltes aus und liegen somit unter denen der quergestreiften Muskulatur (43,9% und 32,4%); anders dagegen bei der Cervix uteri, die

nur 14,6% wasserlösliche, 2,4% kontraktile und 82,9% Stroma-Proteine enthält. Außerdem konnte CRETIUS zeigen, daß der Gehalt an kontraktilen Proteinen des Uterus stark von der Funktion abhängt; die wasserlöslichen Eiweiße in Corpus und Cervix steigen in der Schwangerschaft auf 40,8% bzw. 44,2% an und fallen in der Menopause unter den Ausgangswert, während die Stroma-Proteine zur Zeit der Gravidität stark abfallen (51,8% bzw. 52,5%) und nach der Geschlechtsreife wiederum ansteigen (70,8%). Das Uterusmyometrium besitzt nur 20% des ATP Gehaltes der Skelettmuskulatur; doch steigt auch dieser im Verlauf der Schwangerschaft bis auf das Doppelte an. Besonders befaßten sich CRETIUS und Mitarbeiter mit dem Kollagengehalt des Uterus (20, 21). Dabei unterschieden sie zwischen NaCl- und Citrat-löslichem Kollagen; sie stellten fest, daß der Gesamtkollagengehalt in der Cervix deutlich höher liegt als im Corpus, während der Schwangerschaft aber in beiden stark zunimmt und in der Menopause wiederum tiefer liegt als zur Zeit der Geschlechtsreife. Diese Ergebnisse wurden von DUBRAWSZKY, 1965 (29, 30), JAEGER, 1965 (52), JAISLE et al., 1961 (55) und SCHWALM et al., 1958 (96) bestätigt. Bei seinen Untersuchungen verwendete CRETIUS 0,5 M KCl-Lösung mit ATP-Zusatz, bzw. 0,5 M KCl zusammen mit 0,005 M Tris-HCl-Puffer und 0,001 M $MgCl_2$ im Verhältnis 1:3 zur Proteinextraktion und homogenisierte das Uterusgewebe mit dem Ultraturrax.

GRAHAM et al., 1955 (39) untersuchten verschiedene gynäkologische Tumoren, wobei sie das Homogenat durch Gaze filterten, den Rest nochmals mit Sand zerrieben und die Proteine mit 0,14 M KCl-Lösung (pH = 8,5) extrahierten; den so gewonnenen Extrakt benutzten sie zur Antigenherstellung.

HOLLMANN et al., 1954 (51) extrahierten Proteine der Uterusmuskulatur mit 0,06 M KCl + 0,04 M $NaHCO_3$ + 0,01 M $Na_2CO_3$ und veränderten den pH-Wert. Dabei fanden sie ein Löslichkeitsminimum der Uteruseiweiße bei einem pH von 5,0; zu beiden Seiten dieses Wertes stieg die Proteinlöslichkeit steil an.

JAISLE, 1960-1965 (53, 54) untersuchte den Tropomyosingehalt der menschlichen Uterusmuskulatur und fand in der Cervix einen Gehalt dieses globulären Strukturproteines von 7,01 mg/g und im Corpus von 10,85 mg/g Frischgewebe; in der Schwangerschaft fällt dieser auf 6,49 bzw. 8,14 mg und beim Fibroleiomyom auf 5,86 mg ab, während er beim Myom auf 14,8 mg/g Frischgewebe ansteigt. Er extrahierte bei seinen Versuchen die Proteine mit 0,1 M KCl-Lösung (pH = 7,0) und homogenisierte mit dem Ultraturrax.

NEEDHAM et al., 1963 (78) verwendeten bei ihren Arbeiten über Eiweiße von gemahlenen Rattenuteri als Extraktionslösungen gepufferte 0,5 M KCl von pH = 7,1 und 0,1 n NaOH. Sie wie auch ZINOVIEVA, 1959 (111), der kontraktile Proteine aus der Uterusmuskulatur mit einer neutralen Chlor-Kalium-Lösung unter Zusatz von Adenosin-Triphosphorsäure

gewann, bestätigten in ihren Versuchen die Ergebnisse von CRETIUS.

b) Elektrophoretische Untersuchungen des Uterus

BLASIUS et al., 1955 (8) verglichen Eiweißpherogramme aus entbluteten und nicht entbluteten Uteri und fanden lediglich in der Myogenkomponente einen Unterschied, da diese bei dem nicht entbluteten Gewebe noch breiter und heterogener war. Die dargestellten Eiweißfraktionen stimmten mit denen von NAESLUND (s. unten) überein.

BOMBIANI et al., 1960 (9) machten in ihren papierelektrophoretischen Untersuchungen von Uterusmuskeleiweißen deutlich, wie sehr die erhaltenen Ergebnisse von der Ionenstärke und dem pH-Wert des Extraktionsmediums wie auch der Pufferlösung der Elektrophorese abhängig sind.

DEMLING, 1954 (25) untersuchte die Frage, ob die dem Albumin entsprechende Fraktion nicht immer dort erhöht ist, wo eine vermehrte Zellproduktion auftritt, da diese Fraktion sowohl im Uterus und lymphatischen Gewebe wie auch bei Carcinomen und Sarkomen oft erhöht ist. Demnach erwartete er beim Uterus-Carcinom eine besonders hohe dem Albumin entsprechende Komponente, mußte jedoch feststellen, daß diese zwar erhöht war im Verhältnis zum normalen Gewebe, aber deutlich kleiner war als die dem $\beta$ - und $\gamma$ - Globulin entsprechenden Fraktionen, die besonders stark vermehrt waren.

HENNING et al., 1953 (44) verglichen den Eiweißgehalt verschiedenster Organe und freier Zellen mit Hilfe der Papierelektrophorese. Sie fanden beim Uterus und lymphatischen Gewebe sowie bei freien Lymphozyten einen relativ hohen Gehalt der 1. Fraktion, während alle anderen Organe wie Gehirn, Lunge, Herz- und Skelettmuskel, Leber Pankreas und Niere eine niedrige 1. Fraktion aufwiesen.

HEINEN und HESSE 1965 (43, 45) untersuchten die Proteinunterschiede zwischen normalem und hypertrophischem Myometrium mit Hilfe der Agar- und Immunelektrophorese. In ihren Extrakten aus 0,14 M KCl-Lösung fanden sie in der Agarelektrophorese bei normalem Uterusgewebe 9 und bei der Myohypertrophie 10 Proteinfraktionen,da bei letzteren zusätzlich eine dem Albumin vorausgehende Fraktion vorhanden war; im Gegensatz zum normalen Uterus war außerdem die dem Albumin entsprechende Komponente erhöht, während die den Globulinen entsprechenden vermindert waren. In der Immunelektrophorese konnten sie davon bei der normalen Uterusmuskulatur 5 und bei der Myohypertrophie 8 als serumidentisch nachweisen. Besonders fiel ihnen auf, daß das $\gamma_1$-Glykoproteid nur bei der Myohypertrophie vorhanden war, während die normale Uterusmuskulatur ein $\beta_2$-Glykoproteid enthielt, das wiederum der Myohypertrophie fehlte.

HÖHNE et al., 1954 (50) fanden beim Portio-Carcinom eine

relative Verminderung der dem Albumin entsprechenden Fraktion und demzufolge einen Albumin/Globulin-Quotienten, der 0,4 nicht überstieg.

NAESLUND et al., 1951 (77) führten als erste papierelektrophoretische Untersuchungen an der menschlichen Uterusmuskulatur durch und konnten 3 verschiedene Fraktionen darstellen, die sie als Myoalbumin, Aktomyosin und Myogen ansahen.

REINHARDT et al., (87) untersuchten das Endometrium bei Uterus myomatosus nach Spülung in physiologischer NaCl ohne präparative Aufarbeitung sofort in der Immunelektrophorese, was sich jedoch bei der Portio uteri als unmöglich herausstellte. Sie konnten 8 bis 10 Fraktionen darstellen, von denen sie 7 analytisch als serumidentisch definierten. Dabei unterschieden sie 1 Präalbumin, das nicht mit Antialbumin reagierte, 1 Albumin, das eine stark positive Reaktion gegen Antialbuminserum zeigte, 2 deutliche Präzipitationsbögen im $\gamma_1$-Bereich und 1 bis 2 schwache im Bereich der $\gamma_2$-Globuline; Transferrin lag an typischer Stelle und zeigte eine deutliche Präzipitation mit Anti-Transferrin, während $\beta_2$ meist fehlte; die $\gamma$-Komponente war stets deutlich vorhanden und reagierte eindeutig mit Anti-$\gamma$-Serum.

SCHMETKAMP, 1954 (93) konnte 4 Fraktionen der Uruseiweiße mit der Papierelektrophorese nachweisen. Der Gesamteiweißgehalt betrug 3,97 g% und war beim Myom auf 4,13 g%

erhöht; außerdem fand er beim Uterus myomatosus eine erniedrigte 2. Fraktion, während alle anderen, besonders die 1. Fraktion, erhöht waren.

Im Gegensatz dazu fand WÄCHTER, 1955 (107) in seinen Untersuchungen des Myomgewebes eine erhöhte 2. Fraktion. Ansonsten jedoch bestätigte er die Ergebnisse von SCHMETKAMP.

5. Fraktionierung der Gewebe mit Hilfe der Ultrazentrifugation.

Bei den vergleichenden Untersuchungen löslicher Gewebeproteine aus verschiedenen Organen kommt der präparativen Ultrazentrifugation eine immer größere Bedeutung zu. Am meisten werden mit diesem Verfahren stoffwechselaktive Organe, die subzelluläre Fraktionen und besonders Mitochondrien in hohem Maße beinhalten, untersucht; denn nach THEMANN, 1968 (105) ist die Anzahl der Mitochondrien direkt proportional der Stoffwechselaktivität des entsprechenden Gewebes. So stellt die Leber, die von EMMELOT et al., 1964 (33), JUNGBLUT, 1963 (58), LUNDKVIST et al., 1964 (71), PERLMANN et al., 1964 (82), RODBYN et al., 1965, (89) SZÉCSEY et al., 1966 (103), THOMPSON et al., 1961 (106), WEBB et al., 1964 (108) und vielen anderen Autoren untersucht wurde, das beliebteste Studienobjekt für die Ultrazentrifuge dar. Doch auch andere Gewebearten werden schon seit längerer Zeit mit Hilfe der Ultrazentrifugation

durchforscht. So konnten BONATTI et al., 1964 (10) und RAPP et al., 1964 (85) die subzellulären Fraktionen der Magenmucosa bis zu den Ribosomen darstellen; von KLEIST et al., 1966 (62) gewannen Mikrosomen des Colon-Carcinomes zur Immunisierung von Kaninchen.
Weitere Untersuchungen mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurden von AMBERSON et al., 1949 (3) am Pectoralismuskel des Kaninchens, BEHEIM et al., 1968 (6) am Walker-Carcinom der Ratte, FREEMAN, 1965 (35) am Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus, OESTERLE, 1966 (80) am menschlichen Gehirn und RÜMKE, 1965 (90) an der Mamma durchgeführt. Die meisten der genannten Autoren verwendeten in ihren Untersuchungen mit der Ultrazentrifugation zur Proteinextraktion Saccharoselösung verschiedener Molarität.

Bereits CRETIUS und JAISLE, 1962 (23, 56) verwendeten bei ihren Studien zum Verhalten des ATP's in der Uterusmuskulatur die Ultrazentrifugation und isolierten Mitochondrien und Mikrosomen, denen sie mehr als 2/3 der ATP-ase Spaltungsrate zuordneten. CARROLL et al., 1968 (13, 14) gelang es am Myometrium uteri Zellmembranen darzustellen, während TENG et al., 1967 (104) Ribosomen aus Rattenuteri isolieren konnten.

## III. Eigene Untersuchungen

### A. Methodik

#### 1. Material und Vorbereitung

##### a) normales Collum uteri

Bei Portioamputationen und Totalextirpationen von Uteri wegen Uterus myomatosus, Ovarial-Carcinom und Descensus wurden von 62 Patientinnen Cervices gesammelt, die bei histologischer Kontrolle als nicht pathologisch befunden wurden. Das durchschnittliche Alter der Patientinnen lag bei 38,4 Jahren; dabei war die jüngste 23 Jahre und die älteste 65 Jahre alt. 48 dieser Patientinnen befanden sich vor, 14 nach der Menopause. Das Durchschnittsgewicht der Cervixes lag bei 18 bis 19 g (von minimal 3 g bis maximal 35 g); insgesamt wurden in unseren Versuchen etwa 1200 g verarbeitet.

Die Cervices wurden vom Perimetrium befreit, in kleine Würfel von ca. 2 mm Kantenlänge geschnitten und in Gazesäckchen unter fließendem Wasser bis zur makroskopischen Blutarmut gespült. Dabei wurden die Gazebeutel oft ausgepreßt und ihr Inhalt gewendet, um das Blut möglichst vollständig auszuwaschen, wozu je nach Blutgehalt des Gewebes 24 bis 36 Stunden benötigt wurden. Nach etwa 12-stündigem Tieffrieren bei -80°C wurde das Gewebe 48 Stunden im β-Gerät (Fa. Christ, Osterode/Harz) lyophilisiert. Hierbei richteten wir uns hauptsächlich nach den Angaben von Mac KENZIE et al., 1967 (72), die die

Einflüsse des Einfrierens und der Gefriertrocknung auf die Organeiweiße als relativ gering ansehen. Die so erhaltene Trockensubstanz betrug noch etwa 20% ihres Frischgewichtes und wurde dann bis zur Weiterverarbeitung wiederum in der Tiefkühltruhe bei -80°C aufbewahrt.

b) Collum-Carcinom

Ein Grundproblem dieser Arbeit war die Beschaffung ausreichender Mengen Carcinom-Gewebe. Da wir nur frisches Gewebe verarbeiten wollten, konnten wir nur einen Teil der von 1966 bis 1968 in der Universitäts-Frauenklinik Homburg/Saar (Direktor Prof. Dr. med. H. Limburg) behandelten Collum-Carcinome verwenden. Zur Untersuchung wurden dabei 44 Patientinnen mit exophytisch wachsenden Collum-Carcinomen der Stadien II bis IV (35 III, 7 II, 2 IV) herangezogen; von diesen war die jüngste Patientin 29, die älteste 76 Jahre alt, der Alterdurchschnitt betrug 53,8 Jahre. 16 Patientinnen befanden sich vor und 28 nach der Menopause. Bei der histologischen Kontrolle handelte es sich um 39 Plattenepithel- und 5 Adeno-Carcinome. Mit Ausnahme von 2 Collum-Carcinomen, die wir durch Totalextirpationen des Uterus erhielten, gewannen wir das Carcinom-Gewebe durch Abtragung des Exophyten oder mittels Cürettage mit dem scharfen Löffel. Dabei betrug das durchschnittliche Gewicht des Carcinom-Gewebes 4 bis 5 g (von unter 1 g bis maximal 30 g). Die weitere Verarbeitung erfolgte wie beim Normalgewebe. Da jedoch der Blutgehalt des Carcinom-Gewebes be-

trächtlich höher lag als beim Normalgewebe, mußte ersteres auch längere Zeit mit Wasser durchspült werden.

2. Vorversuche und Eiweißbestimmung

In Vorversuchen wurde das Extraktionsmedium ermittelt, das für unsere Zwecke am geeignetsten war. Daher untersuchten wir die folgenden 5 Extraktionslösungen hinsichtlich ihrer quantitativen Proteinausbeute (s. Tab. 1).

Alle Voruntersuchungen erfolgten am normalen Cervix-Gewebe, das aus oben genannten Gründen in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand. 1,5 g lyophilisiertes Gewebe (Technik siehe Kap. III, A, 3 c) wurden mit 30 ml der jeweiligen Extraktionsflüssigkeit versetzt und unter häufigem Umrühren 24 Stunden im Kühlschrank bei ca. 4°C extrahiert. Anschließend wurde das Gewebe homogenisiert. Dazu benutzten wir anfangs den Ultraturrax (Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen/Breisgau), doch mußten wir dieses Verfahren wieder verlassen, da das Gewebe dabei trotz Eiskühlung innerhalb von 2 bis 3 Minuten bis über 60°C erhitzt wurde und eine grau-schwarze Farbe annahm. Daraufhin bedienten wir uns des Gewebehomogenisators Typ h0 der Fa. Edmund Bühler, Tübingen, der das Material durch rotierende Messer zerkleinert und mit Wasserkühlung arbeitet. Dabei nahm die Temperatur selbst nach einer andauernden Homogenisation von 5 bis 10 Minuten bis nur maximal 25 bis 30°C zu und das Gewebe behielt

Tab. 1: Zusammensetzung der verschiedenen Extraktionslösungen

| | | |
|---|---|---|
| Na-Phosphat-Puffer: | 0,06 M $NaH_2PO_4$<br>0,048 M $Na_2PO_4$ | pH = 7,1 |
| Saccharose: | 0,25 M Saccharose | pH = 4,4 |
| Karbonat-Puffer: | 0,03 M $NaHCO_3$<br>0,5 M KCl | pH = 8,0 |
| Veronal-Puffer nach MICHAELIS: (Modif. von WIEDEMANN) | 0,143 M Veronal-Na<br>0,143 M Na-Acetat<br>+ n/10 HCl<br>Ionenstärke 0,1 u | pH = 8,2 |
| Kaliumchloridlösung: | 0,14 M KCl | pH = 5,9 |

seine natürliche gelb-weiße Farbe. Da uns aber auch diese Temperatur noch sehr hoch erschien, wurden alle benötigten Gefäße eisgekühlt und die Kühlung des Homogenisators bereits 10 Minuten vor dem eigentlichen Arbeitsgang angestellt. Das Gewebe wurde sodann 5x2 Minuten homogenisiert, wobei jeweils nach 2 Minuten eine längere Pause zwischengeschaltet wurde. So gelang es uns, die Temperatur tief zu halten. Nach ca. 10 Minuten war ein fast homogener Gewebebrei entstanden, der bei mikroskopischer Kontrolle hauptsächlich aus faserigem Zelldetritus, Zell-

kernen und Kernfragmenten bestand.

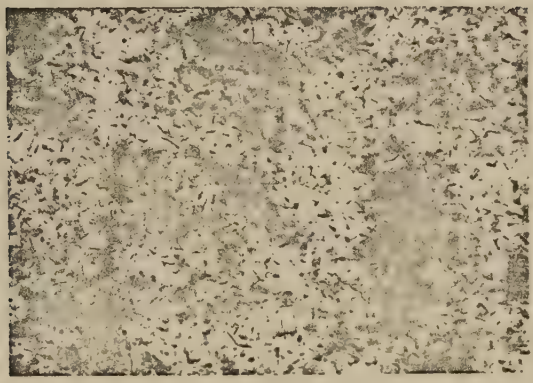


Abb. 1: Kontrolle des Collum-Homogenates im Lichtmikroskop. Es sind keine intakten Zellen mehr nachweisbar. Vergr.: 16x2x8; Färbung nach Papanicolaou

Zum Ausspülen der Gefäße wurden weitere 10 ml Extraktionsmedium benutzt, so daß schließlich auf 1,5 g Trockengewebe 40 ml Flüssigkeit kamen.

Anschließend wurden die ungelösten Teile des Homogenates in der Zentrifuge (Ultrazentrifuge Spinco $L_2$, Beckman Instruments, München, Rotor 50 Ti) 45 Minuten lang bei 0°C und ca. 22 000 g abzentrifugiert.

Der Gesamteiweißgehalt im Überstand wurde durch die Biuret-Methode nach Weichselbaum und Kjeldahl bestimmt. Mit jedem Extraktionsmedium führten wir mehrere der eben beschriebenen Versuche durch und erhielten so die Werte, wie sie aus Tab. 2 ersichtlich sind. Die Mittelwerte der Extraktionsversuche mit verschiedenen Medien zeigt die Tab. 3. Wie die beiden Tabellen zeigen, wurde quantitativ am meisten Eiweiß mit der 0,14 M KCl-Lösung als Extraktionsmedium gelöst. Außerdem unterscheiden sich die Ergebnisse stark in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode.

Bei der Kjeldahl-Methode wird die Ammoniakmenge und damit der Stickstoffgehalt einer Lösung bestimmt. Dabei wird der durchschnittliche N-Gehalt des Nahrungseiweißes von 16% zugrunde gelegt und so durch Multiplikation des Gesamtstickstoffgehaltes mit dem Faktor 6,25 auf die Eiweißmenge der Lösung geschlossen. Zuvor allerdings muß man durch Eiweißfällung mittels Trichloressigsäure den Rest-N der Lösung bestimmen - dessen Hauptanteil sich aus Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak, Kreatin und Kreatinin zusammensetzt - und diesen Wert von der Gesamt-N-Menge abziehen. Das Prinzip dieser Eiweißbestimmung besteht darin, daß die nachzuweisenden N-haltigen Substanzen durch Veraschung mit Schwefelsäure unter Mitwirkung von Katalysatoren (Kupfersulfat) in Ammoniak umgewandelt und von der Schwefelsäure als Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$

Tab. 2: Mittelwerte von je 2 Einzeluntersuchungen pro Extraktionsmedium.

| Extraktionslösung | Eiweißgehalt nach Kjeldahl mg% | nach Weichselbaum mg% |
|---|---|---|
| Na-Phosphat-Puffer | 607,248 | 423,660 |
| | 661,047 | 400,697 |
| | 647,140 | 438,542 |
| | 640,301 | 354,207 |
| | 620,639 | 438,542 |
| | 653,125 | 354,207 |
| 0,25 M Saccharose | 652,347 | 490,650 |
| | 676,357 | 509,389 |
| | 649,518 | 509,389 |
| | 670,095 | 509,389 |
| | 657,570 | 525,821 |
| Karbonat-Puffer | 1393,529 | 932,235 |
| | 1240,300 | 915,385 |
| | 1306,968 | 879,487 |
| | 1311,535 | 879,487 |
| | 1349,894 | 915,385 |
| Veronal-Puffer | 1349,155 | 834,105 |
| | 1361,056 | 866,193 |
| | 1334,113 | 885,879 |
| | 1369,747 | 885,879 |
| | 1390,606 | 885,879 |
| 0,14 M KCl | 2007,378 | 724,680 |
| | 1983,152 | 716,276 |
| | 2088,680 | 781,392 |
| | 2140,986 | 716,276 |
| | 2031,638 | 716,276 |
| | 2024,983 | 846,508 |

Tab. 3: Mittelwerte der Extraktionsversuche an normalem Cervix-Gewebe mit verschiedenen Extraktionsmedien.

| Extraktionslösung | Eiweißgehalt nach Kjeldahl mg% | Eiweißgehalt nach Weichselbaum mg% |
|---|---|---|
| Na-Phosphat-Puffer | 638,25 | 401,64 |
| 0,25 M Saccharose | 661,18 | 508,92 |
| Karbonat-Puffer | 1320,44 | 904,39 |
| Veronal-Puffer | 1360,93 | 871,59 |
| 0,14 M KCl | 2046,13 | 750,23 |

gebunden werden. Durch Zusatz von Natronlauge wird das Ammoniak in Freiheit gesetzt, überdestilliert und in einer Vorlage mit bekannter Menge 2%iger Borsäure aufgefangen. Die Titration der überschüssigen Säure erfolgt des deutlichen Farbumschlages wegen nach der jodometrischen Methode (HALLMANN, 1966 (42).

Bei der Kjeldahl- wie auch bei der Biuret-Methode führten wir bei unseren Versuchen jeweils auch 2 Leerwerte mit, um den Stickstoffgehalt bzw. den Farbkomplex der benutzten Reagenzien zu ermitteln; gleichzeitig ließen wir bei jeder Untersuchung auch 2 Werte mitlaufen, die einen genau definierten Eiweißgehalt besitzen (Labtrol bzw. Pathotrol DADE-REAGENTS INC, USA mit einem Gesamt-

eiweißgehalt von 7 bzw. 5 g% ± 0,2 g), mit deren Hilfe wir unsere eigene Versuchsanordnung überprüfen und eichen konnten.

Das Biuret-Reagenz nach Weichselbaum besteht aus:

| | |
|---|---|
| K-Na-Tartrat | 9,0 g |
| $CuSO_4 + 5\ H_2O$ | 3,0 g |
| KJ | 5,0 g |

mit 0,2 n NaOH ad 1000 ml auffüllen.

4,9 ml physiologische NaCl-Lösung werden mit 0,1 ml Substrat und 5,0 ml Biuret-Reagenz gemischt und mindestens 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen; danach wird die optische Dichte in 2 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 530nm mit dem Photometer PM Q II der Fa. Zeiss gemessen. Die Methode beruht darauf, daß Peptidbindungen, d. h. -CO-NH-Gruppen, mit Kupfersulfatlösung in Natronlauge eine rot-violette Kupferverbindung ergeben. Eine positive Biuretreaktion ergeben demnach alle Verbindungen, die die -CO-NH-Bindung besitzen; sie gilt daher als Nachweis von Harnstoff und Eiweiß.

Van de LOO, 1962 (67) beschreibt in seinen vergleichenden Untersuchungen über die verschiedenen Modifikationen der Biuret-Methode die Abhängigkeit vom Elektrolytgehalt der Proteinlösung; darin stellte sich die Modifikation nach Weichselbaum als besonders elektrolytabhängig heraus.

Aus der teilweisen Trübung der Extraktionslösung und der Abhängigkeit vom Elektrolytgehalt lassen sich auch in unseren Versuchen die großen Differenzen zwischen Kjeldahl- und Biuret-Proteinkonzentration erklären. Die Biuret-Methode wie auch alle anderen colorimetrischen Proteinbestimmungen sind darüberhinaus noch von der Art des Eiweißes abhängig und steigen nicht genau proportional der Proteinkonzentration an (LOWRY et al., 1951 (70). EGGSTEIN et al., 1955 (32) zeigten in vergleichenden Untersuchungen über quantitative Eiweißbestimmungen, daß andere, wie volumetrische und gravimetrische Methoden noch ungenauer sind als die colorimetrischen; die gleichen Autoren halten die Kjeldahl-Methode für genau genug, um sie zur Eichung anderer Eiweißbestimmungen anzuwenden.

Aus vorstehenden Ausführungen und unseren Ergebnissen zogen wir den Schluß, daß die Biuret-Reaktion nach Weichselbaum je nach Extraktionsmedium in einem bestimmten Verhältnis zur Kjeldahl-Methode steht und ermittelten daher für jede der verschiedenen Proteinlösungen einen Faktor, der dieses Verhältnis zum Ausdruck bringt. (s. Tab. 4)

Nach der quantitativen Proteinbestimmung wurden die so gewonnen Extrakte nach der unten beschriebenen Methode weiterverarbeitet und zur qualitativen Auswertung der Celluloseazetatfolien-Elektrophorese unterworfen.

Tab. 4: Faktoren, die das Verhältnis der Kjeldahl-Methode zur Biuret-Reaktion nach Weichselbaum ausdrücken.

| Extraktionslösung | Faktor |
|---|---|
| Na-Phosphat-Puffer | 1,59 |
| 0,25 M Saccharose | 1,29 |
| Karbonat-Puffer | 1,46 |
| Veronal-Puffer | 1,56 |
| 0,14 M KCl | 2,72 |

Vorher jedoch untersuchten wir den Einfluß des Lösungsmittels auf das Elektropherogramm. Dabei verglichen wir die Lösung der lyophilisierten Extrakte (Kap. III, A, 3c) der verschiedenen Extraktionsmedien in aqua bidest. und 0,9%iger NaCl-Lösung. Hierbei zeigten die in NaCl gelösten Extrakte durch allgemein schnellere Beweglichkeit der Komponenten deutlicher abgegrenzte Fraktionen als die in aqua bidest. gelösten. Besonders fiel auf, daß Vorfraktionen mit großer anodischer Wanderungsgeschwindigkeit in wässriger Lösung kaum auftraten, während sie in salzgelösten Karbonat-, Veronal- und KCl-Extrakten deutlich zu erkennen waren; auch diese Ergebnisse zeigten uns wiederum, wie sehr die Proteingewinnung vom verwendeten Extraktions- bzw. Lösungsmittel abhängig ist.

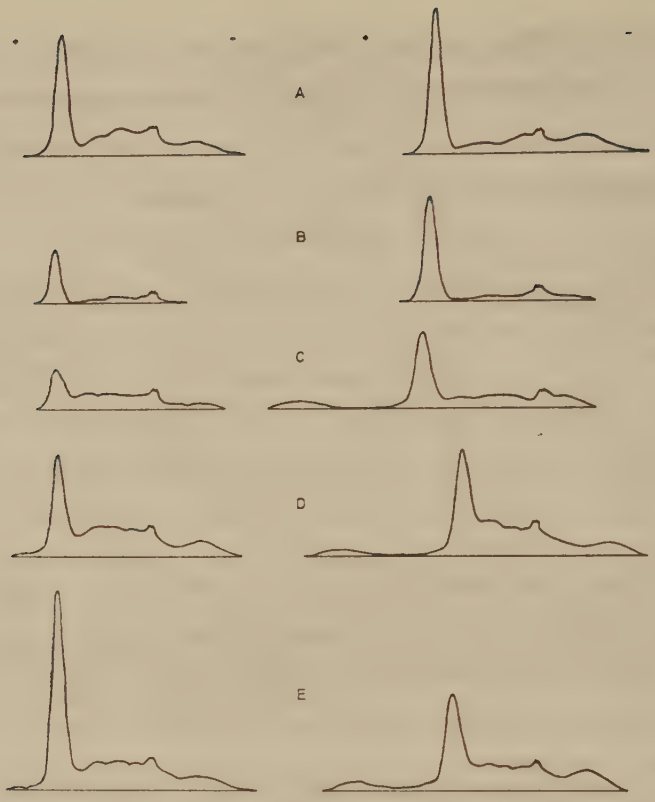



Abb. 2: Einfluß der verschiedenen Extraktionsmedien und Lösungsmittel auf das Pherogramm des Collum uteri-Extraktes.
links : die Proteine wurden nach Extraktion und Lyophilisierung in aqua bidest. gelöst.
rechts: die Auflösung erfolgte in 0,9%iger Kochsalzlösung.

A = Extraktion der Proteine mit Na-Phosphat-Puffer
B = Extraktion der Proteine mit Saccharose
C = Extraktion der Proteine mit Karbonat-Puffer
D = Extraktion der Proteine mit Veronal-Puffer
E = Extraktion der Proteine mit KCl-Lösung

Da jedoch unsere Extrakte in späteren Arbeiten auch in der Agar-Elektrophorese untersucht werden sollten, die eine elektrolytfreie Lösung erfordert, lösten wir unsere lyophilisierten Extrakte im Hauptuntersuchungsgang mit aqua bidest. auf (s. Abb. 2).

3. Hauptuntersuchungsgang

a) Extraktion, Homogenisation, Zentrifugation

Aufgrund der Ergebnisse unserer Voruntersuchungen wählten wir die KCl-Lösung als Extraktionsmedium.
Dabei wurden 50g Trockensubstanz des normalen Collumgewebes mit 1000 ml 0,14 M KCl (pH = 5,9) und 31,18 g Trockensubstanz des Carcinom-Gewebes mit 623,6 ml der gleichen Extraktionslösung- also im Verhältnis 1:20- versetzt und 24 Stunden bei +4°C im Kühlschrank extrahiert.
Die Extrakte wurden sodann in Portionen von ca. 25 ml etwa 10 Minuten im wassergekühlten Gewebehomogenisator (Fa. Edmund Bühler, Tübingen) bis zur völligen Zellzerstörung homogenisiert und für 45 Minuten bei ca. 22 000 g und 0°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge Spinco $L_2$, Beckman, Instruments).

b) Dialyse

Da wir unsere Extraktionen mit KCl-Lösung durchführten, mußten wir vor den elektrophoretischen Untersuchungen das KCl wieder möglichst eliminieren, um eine einwandfreie Wanderung der Eiweißkomponenten im elektrophore-

tischen Feld zu erreichen. Daher wurde der Überstand der Zentrifugation in Zellophanschläuchen (Hersteller: Fa. Visking, USA, Auslieferung für BRD Fa. Huebscher, Hamburg), wie sie in der Hämodialyse Verwendung finden, dialysiert (BRINTZINGER, 1955 (12). Die Porengröße der Dialysiermembran hält weitgehend makromolekulare Substanzen zurück und erlaubt den freien Durchtritt von Molekülen bis in den Bereich der Polypeptide. Es wurden 100 ml des zentrifugierten Extraktes gegen 1000 ml aqua dest. unter öfterem Umrühren 48 Stunden bei 4°C dialysiert; dabei wurde jeweils nach 8 Stunden das aqua dest. gewechselt. Davon abweichend jedoch erfolgte die Dialyse der Ultrazentrifugation (s. Kap. III, A, 3 d). Das Dialysat wurde anschließend bei -80°C tiefgefroren.

c) Lyophilisierung und Einengung

Die tiefgefrorenen dialysierten Extrakte wurden sodann im β-Gerät (Fa. Christ, Osterode/Harz) gefriergetrocknet. Bei diesem Verfahren wird der Wasserdampf, der laufend an der Oberfläche des gefrorenen Materials entsteht, ständig durch ein Vakuum entfernt. Mit diesem Trocknungsprozeß, der für den Extrakt außerordentlich schonend ist, wurde die Substanz innerhalb von 120 Stunden bis auf eine Restfeuchtigkeit von etwa 1% getrocknet.

Die so gewonnene Trockensubstanz wurde mit aqua bidest. bis zur Sättigung aufgelöst. Die gesättigte Lösung des Collumextraktes hatte einen Gesamteiweißgehalt von 4756,71 mg%, die des Collum-Carcinomes von 3411,50 mg%

(Kjeldahl). Für die vergleichenden qualitativen Untersuchungen in der Elektrophorese wurde darauf der Proteingehalt des Normalextraktes ebenfalls auf 3411,50 mg% Gesamteiweiß nach Kjeldahl eingestellt.

d) Ultrazentrifugation

Bei der Aufarbeitung des Collum uteri mit der präparativen Ultrazentrifugation stießen wir, wie auch oben genannte Autoren (Kap. II, 5) bereits am Corpus uteri auf große Schwierigkeiten, da das Collum hauptsächlich aus Bindegewebe besteht und sein Muskelanteil maximal 15 bis 20% je nach Funktionszustand beträgt (s. Kap. II, 4a). Darüberhinaus sind die nur gering vorhandenen Muskelzellen an der nicht graviden Cervix strukturarm; das Sarkoplasma enthält nur wenig Zellorganellen und Granula, das endoplasmatische Retikulum ist nur schwach ausgebildet. Die Bindegewebefasern bilden ein Gerüst, in dessen Zwischenräumen sich eine amorphe Grundsubstanz aus Mukopolysacchariden befindet. Dieses Bindegewebegerüst besteht aus elastischen und kollagenen Fasern, wobei letztere weit überwiegen (CRETIUS et al., 1966 (20, 21), JAEGER, 1965 (52) und KAO et al., 1967 (59).

Demnach liegt bei der präparativen Ultrazentrifuge das Hauptproblem in der Aufarbeitung des Bindegewebes; daher werden wir nur wenige, kleine Mitochondrien mit schwach ausgebildeter Innenstruktur und in der Hauptsache mizellare Strukturen der Kollagenmoleküle antref-

fen (GIESEKING, 1968 (36). Uns interessiert in dieser Arbeit besonders der Unterschied zwischen normalem und verkrebstem Collum uteri. Bei der Entstehung des Krebses allgemein, wie speziell der des Collum-Carcinoms kommt es durch eine Enthemmung der DNS-Synthese zu einer Kern- und Zellverdoppelung, sowie zu einer abnormen Verteilung des DNS (GRUNDMANN et al., 1960 (40), SANDRITTER et al., 1961 (92). Außerdem nimmt der Anteil des Bindegewebes im Collum-Carcinom deutlich ab (HILLEMANNS, 1961 (46). Daraus ergibt sich für uns die weitere Schwierigkeit einen gemeinsamen Analysengang sowohl für das normale Collum wie auch für das verkrebste Collum uteri zu finden, obwohl sich die beiden Gewebe in ihrer Feinstruktur erheblich unterscheiden. Außerdem ist es eine praktische Erfahrung der Ultrazentrifugation, daß jede subzelluläre Struktur- will man sie ausreichend rein und unzerstört erhalten- eine spezielle Behandlung braucht und pro Untersuchungsgang jeweils nur eine Fraktion sauber sedimentiert werden kann (BAKAY et al., 1964 (5) und LANG et al., 1952 (64).

Da uns einerseits der Mangel an Carcinom-Gewebe zwang, einen einheitlichen, für beide Organtypen gültigen Analysengang durchzuführen und gleichzeitig alle Zellfraktionen darzustellen- sich andererseits aber Reinheit der Fraktionen und quantitative Ausbeute gegenseitig ausschließen- war unser Analysengang bereits vor dem eigentlichen Beginn mit Kompromissen verbunden. Daher können wir bei unserem Untersuchungsverfahren nicht

morphologisch definierte Fraktionen vom Collum uteri und Collum-Carcinom, sondern nur Sedimente gleicher g-Zahl miteinander vergleichen.

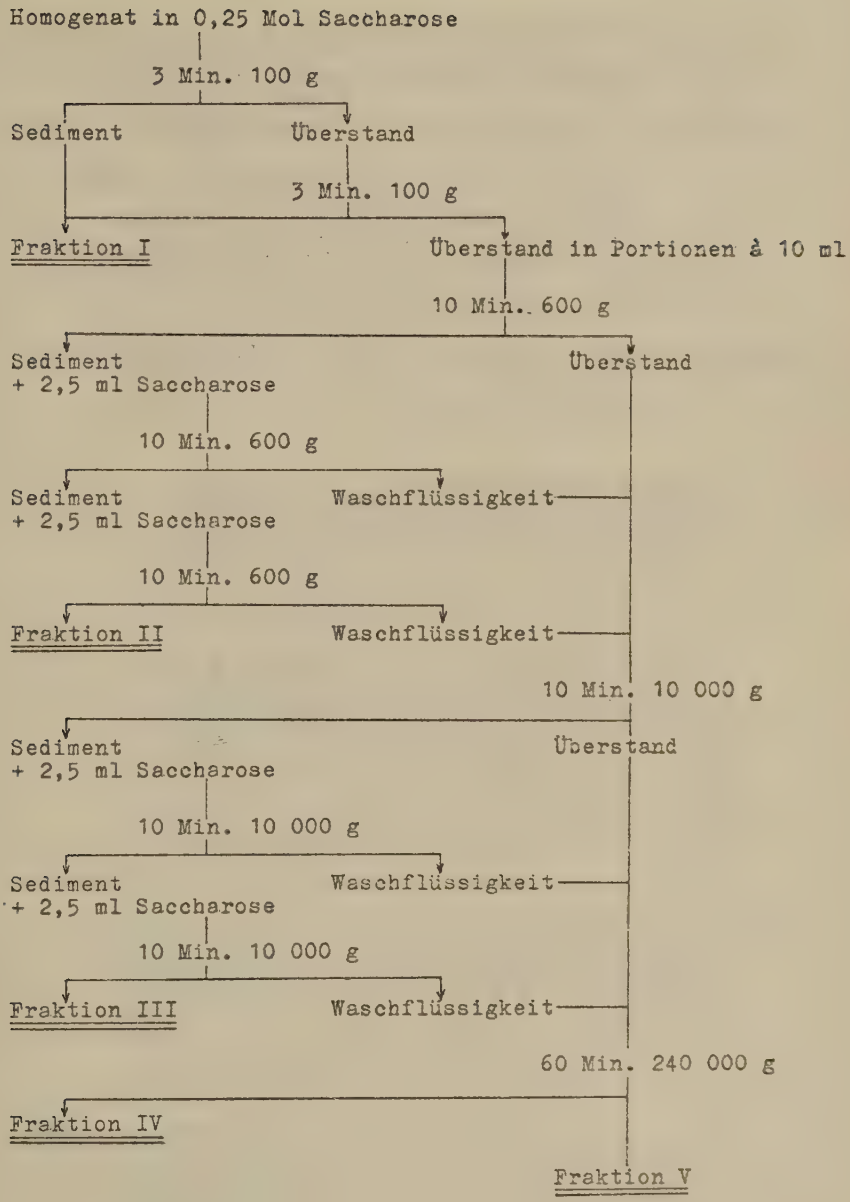
In der Methodik der Ultrazentrifugation richteten wir uns hauptsächlich nach den großen Erfahrungen von LANG und SIEBERT, sowie HOGEBOOM und SCHNEIDER (48, 49, 64, 65, 94, 95, 100, 101), mußten aber auch hier wegen des außerordentlich hohen Gehaltes an Bindegewebefasern entscheidende Änderungen im Analysengang vornehmen.

Größte Bedeutung hat hierbei das Suspensionsmedium, das möglichst wenig der subzellulären Strukturen verändern soll. Nach den oben genannten Autoren ist dazu die isotone 0,25 M Rohrzuckerlösung am besten geeignet. Sie ist apolar und für Zellkerne und Mitochondrien ein viel günstigeres Medium als z. B. Elektrolytlösungen, in denen die Mitochondrien meist geschädigt werden und verklumpen. Daher hielten wir die 0,25 M Saccharose für das beste Suspensionsmedium und führten damit den gesamten Untersuchungsgang durch, der im Einzelnen folgendermaßen verlief:

Frisches, gekühltes Gewebe wurde mit Messern möglichst klein geschnitten und zu je 1 g dieser Gewebestückchen wurden 15 ml der 0,25 M eiskalten Saccharoselösung gegeben. Dieses Gemisch wurde im vorgekühlten Messerhomogenisator (Fa. Bühler, Tübingen) bei niedriger Umdrehungszahl so lange zerkleinert, bis ein Gewebebrei entstand, der danach durch ein Plastiksieb (1 mm Ma-

schenweite) passiert wurde. Mit diesem Verfahren konnten grob zusammenhängende Faserbündel, wie sie besonders im normalen Columgewebe vorkommen, zurückgehalten werden. Danach wurde der Gewebebrei im Potter-Elvehjem-Homogenisator (Fa. Janke & Kunkel, Staufen/Breisgau) 5 Minuten bei maximal 2000 U/Minute weiter zerkleinert. Das so erhaltene Homogenat wurde anschließend der Ultrazentrifugation unterworfen.

Im ersten Arbeitsgang wurde das Homogenat 3 Minuten in der normalen Laborzentrifuge bei ca. 100 g geschleudert. Das so erhaltene Sediment bestand bei mikroskopischer Kontrolle aus groben Fasergeflechten mit eingeschlossenen Zellen. Der trübe Überstand wurde erneut 3 Minuten lang bei ca. 1000 g zentrifugiert und das hierbei erhaltene Sediment als Fraktion I bezeichnet. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in der Ultrazentrifuge (Spinco $L_2$, Beckman Instruments, München, Rotor 50 Ti) bei 0°C 10 Minuten mit 600 g geschleudert, das Sediment zweimal mit Saccharose aufgenommen und erneut mit gleicher Zeit und Umdrehungszahl zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment = Fraktion II, bestand bei lichtmikroskopischer Kontrolle hauptsächlich aus Zellkernen neben kleineren Fragmenten aus Bindegewebefasern. Die bei dieser g-Zahl gewonnenen Überstände wurden 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert, die Sedimente wiederum zweimal mit Saccharose aufgenommen und erneut mit gleicher g-Zahl 10 Minuten geschleudert. Das so gewonnene


Homogenat in 0,25 Mol Saccharose
3 Min. 100 g
Sediment
Überstand
3 Min. 100 g
Fraktion I
Überstand in Portionen à 10 ml
10 Min. 600 g
Sediment
+ 2,5 ml Saccharose
Überstand
10 Min. 600 g
Sediment
+ 2,5 ml Saccharose
Waschflüssigkeit
10 Min. 600 g
Fraktion II
Waschflüssigkeit
10 Min. 10 000 g
Sediment
+ 2,5 ml Saccharose
Überstand
10 Min. 10 000 g
Sediment
+ 2,5 ml Saccharose
Waschflüssigkeit
10 Min. 10 000 g
Fraktion III
Waschflüssigkeit
60 Min. 240 000 g
Fraktion IV
Fraktion V

Sediment = Fraktion III enthielt bei elektronenoptischer Kontrolle vorwiegend Mitochondrien und Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Die Überstände wurden sodann 60 Minuten bei ca. 240 000 g zentrifugiert; das sehr festhaftende klebrige Sediment = Fraktion IV besaß eine rötliche Farbe und enthielt in der Hauptsache Kollagen. Der gewonnene Überstand = Fraktion V wie auch alle übrigen Fraktionen wurden nach oben beschriebener Methode weiterverarbeitet.

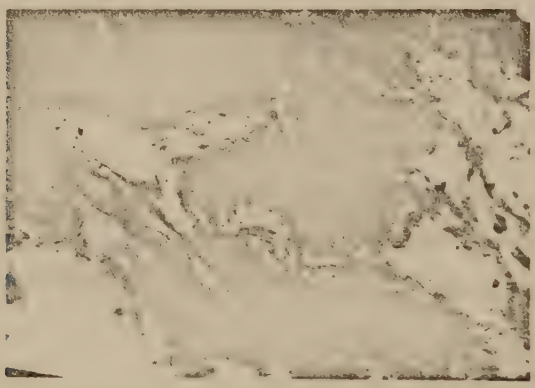


Abb. 3: Kontrolle der Fraktion I (100 x g) des Collum uteri (Lichtmikroskop). In dichten Bindegewebegeflechten liegen vereinzelt Kerne.
Vergr.: 16 x 2 x 8
Färbung nach Papanicolaou

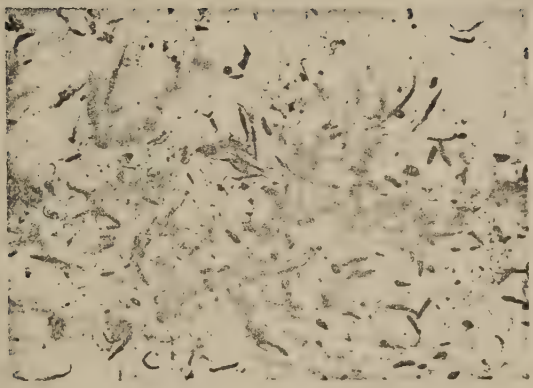


Abb. 4: Kontrolle des Ultrazentrifugensedimentes II (600 x g) des Collum uteri (Lichtmikroskop). Neben Bindegewebefragmenten finden sich vorwiegend Kerne.
Vergr.: 16 x 2 x 8
Färbung nach Papanicolaou

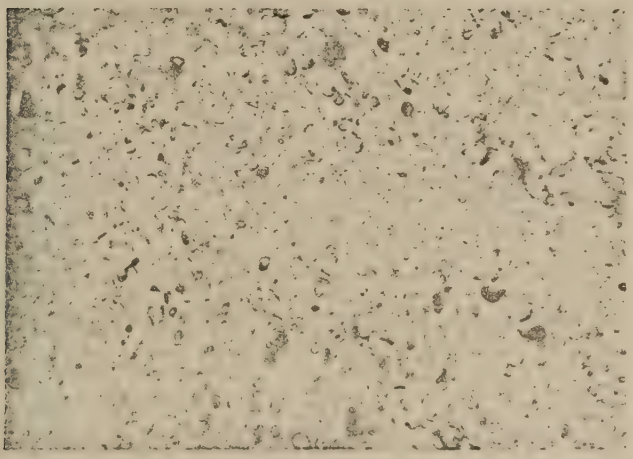


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Kontrolle des Ultrazentrifugensedimentes III (10 000 x g) des Collum uteri.
Vorwiegend Membranen des endoplasmatischen Retikulums.
Vergr.: 8000

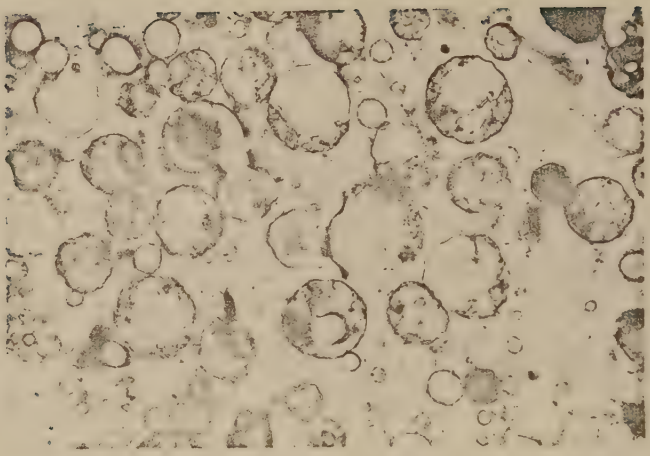


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Kontrolle des Ultrazentrifugensedimentes III (10 000 g) des Collum uteri.
An einigen Stellen des Schnittes finden sich Anhäufungen von Mitochondrien.
Vergr.: 8000

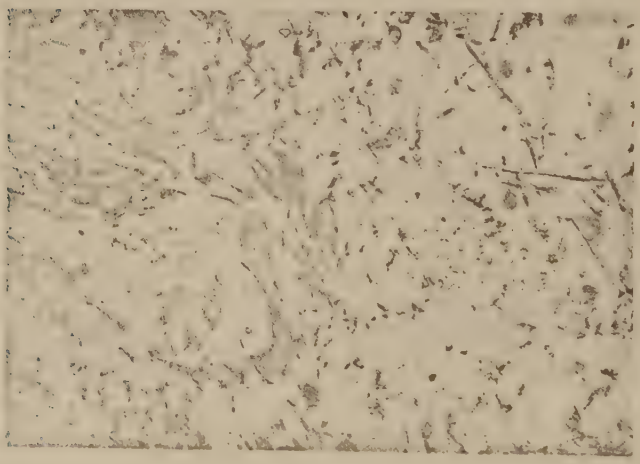


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Kontrolle des Ultrazentrifugensedimentes IV (240 000 g) des Collum uteri.
Aus der Querstreifung der Filamente ist zu erkennen, daß es sich um Aggregationsformen von Kollagenmolekülen handelt.
Vergr.: 8000

Die einzelnen Fraktionen wurden zunächst dialysiert, und zwar 400 ml Fraktion gegen 10 000 ml aqua dest. Da es sich als schwierig erwies, die Saccharose auf diese Weise aus den Fraktionen zu eliminieren, mußten wir dem aqua dest. Veronalpuffer und außerdem KCl als Elektrolyt zusetzen. Dennoch dauerte die Dialyse- wobei zweimal pro Tag die Dialyseflüssigkeit gewechselt wurde- länger als bei den zentrifugierten Homogenaten, denn erst nach 72 Stunden fiel die Molisch-Probe im Dialysat nur noch ganz schwach positiv aus, womit wir die Dialyse als ausreichend ansahen.

Danach wurden die Sedimente I bis IV im Ultraturrax für 2 Minuten kurz aufgewirbelt und dann extrahiert. Hierbei wendeten wir die gleiche Methodik an, wie sie bereits oben zur Herstellung der Organextrakte beschrieben wurde. 1 g Sediment wurde mit 4 ml 0,14 M KCl-Lösung 24 Stunden extrahiert, sodann in der Ultrazentrifuge für 45 Minuten bei $0^{\circ}$ C mit ca. 20 000 g geschleudert, die Überstände dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Fraktion V wurde nach der Dialyse ohne Extraktion sofort gefriergetrocknet.

e) Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese

Die Schwierigkeit der elektrophoretischen Auftrennung von Organeiweißen besteht nach KESSEL, 1960 (61) darin, daß die Zellproteine konjugierte Proteine und daher

wesentlich heterogener als die Serumeiweiße sind.

Zur Untersuchung über die qualitative und quantitative Zusammensetzung unserer Proteinlösungen bedienten wir uns der Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese (CONSDEN et al., 1959 (16) und KOHN, 1958 (63). Diese Methode bietet gegenüber der Papierelektrophorese gewisse Vorteile, da die Proteine weniger im Medium hängenbleiben und das Medium selbst von den verwendeten Farbstoffen kaum angefärbt wird (HITZIG, 1963 (47). Außerdem konnte die Dauer der elektrophoretischen Trennung, die auch bei diesem Verfahren früher noch 60 bis 120 Minuten betrug (KOHN, 1958 (63), heute auf 20 bis 25 Minuten herabgesetzt werden.

Bei unseren Untersuchungen bedienten wir uns des Mikrozon-Elektrophorese-Systems Modell R-101 (Beckman Instruments, München). Dieses besteht aus einer Plexiglas-Mikrozelle, die in zwei Elektrolytgefäße unterteilt ist; diese kommen bei der Entfernung der Brücke durch einen Heber, der das Flüssigkeitsniveau ausgleicht, in Kontakt miteinander, während der elektrophoretischen Trennung jedoch sind sie voneinander getrennt. Das Gewicht der Brücke hält den Heber über der Pufferoberfläche, wodurch ein Kurzschluß beim Arbeiten mit der Zelle verhindert wird. Entfernt man die Brücke, so erfolgt ein exakter Ausgleich des Flüssigkeitsniveaus. Zwei Platinelektroden durchlaufen beiderseits entlang der Mittelwand die Zelle. Die

kaskadenförmige Anordnung von mehreren Zwischenwänden in der Zelle verlängert die Diffusionsstrecke der Elektrolyseprodukte und verhindert deren Diffusion in die Membranenden. Die beiden Pufferreservoirs werden mit 265 bis 285 ml Beckman $B_2$-Puffer (pH = 8,6, Ionenstärke = 0,075 $\mu$) bis zur Marke aufgefüllt. Dieses Puffersystem leitet sich von der Plasma-Elektrophorese ab, denn alle Plasmaproteine sind bei einem pH von 8,2 bis 8,6 und einer Ionenstärke von $\mu > 0,1$ auf der alkalischen Seite ihres IEP und wandern entsprechend ihrer negativen Ladung zur Anode (WUHRMANN et al., 1957 (110). Die Membran als Trägermedium wird vorsichtig auf die Brücke gelegt und mit Hilfe einer Spannvorrichtung horizontal in gleichmäßigem Kontakt mit der Pufferlösung gehalten, so daß ein Pufferüberschuß verhindert und ein gleichmäßiges Auftragen der Proben gewährleistet ist. Der Zelldeckel liegt unmittelbar über der in die Zelle eingesetzten Membran und ist mit 8 Auftragespalten und 3 Führungsrillen für den Auftragestempel versehen, die einen genauen Auftrag der Proben ermöglichen. Mit einem Mikroauftragestempel aus zwei parallel laufenden Lamellen, die durch Kapillarwirkung 0,25 $\mu$l der Probe aufnehmen, kann man 8 verschiedene Proben der Eiweißlösung parallel nebeneinander auf die Membran auftragen. Diese besteht aus 130 Mikron dickem, schwammigem Zelluloseazetat-Material, das sich aus untereinander verbundenen kugeligen Zwischenräumen mit einem Durchmesser <2 Mikron zusammensetzt. Die Membran ist porös und erlaubt freien, aber kontrollierbaren Pufferfluß durch die Zwischenräume.

Schwanzbildungen im Anschluß an die einzelnen Fraktionen werden verhindert, da die Zellulose im Gegensatz zum Filterpapier keine Proteine adsorbiert. Nach Auftragung der zu untersuchenden Proben wird der Zelldeckel mit einer Platte verschlossen. Während der Trennzeit von ca. 20 Minuten ändert sich die Stromstärke - bei konstanter Spannung von 250 mV - von anfangs 3,5 bis 5,8 mA auf eine Endstromstärke von 4,5 bis 9,5 mA. Anschließend wird die Membran, da die Azetatfolie sehr empfindlich ist, vorsichtig mit einer Pinzette von der Brücke abgehoben und sodann fixiert. Diese Fixativ-Farbstofflösung besteht aus:

0,2 Gew.% Ponceau-S
3,0 Gew.% Trichloressigsäure in aqua dest.
3,0 Gew.% Sulfosalicylsäure

Nach 7 bis 10 Minuten wird die Membran in einem Bad aus 5 Volwiger Essigsäure in aqua dest. so lange gewaschen, bis sie farblos wird. Nach nochmaligem Waschen in 95%-gem Äthanol wird die Membran in einem Bad aus 25%igem Eisessig und 75%igem Äthylalkohol transparent gemacht. Danach wird die Membran sorgfältig ohne Blasen- und Faltenbildung auf eine Glasplatte gezogen und 10 bis 15 Minuten im Brutschrank bei 100°C getrocknet. Die nun trockene Membran wird in einer dünnen Plastikhülle aufbewahrt.

4. Auswertung

a) Spektographie

Das Pherogramm wurde dann spektophotometrisch mit dem Auswertgerät "Analytrol", Modell R-102 (Beckman-Instruments, München) aufgezeichnet und quantitativ ausgewertet. Dieses Gerät ist mit einer Kompensationsscheibe und einem 500 mu Interferenzfilter ausgestattet und registriert die Farbstoffkonzentration der Proteinbanden in einem linearen Verhältnis. Das "Analytrolgerät" übt gleichzeitig zwei Funktionen aus. Es mißt die optische Dichte, zeichnet diese mit Hilfe eines Schreibhebels in Form von Kurven auf Milimeterpapier auf und integriert sie gleichzeitig. Die Integratorfeder schreibt eine Sägezahnlinie am unteren Rand des Papiers, die ein Maß für die Fläche unter den registrierten Kurvenabschnitten darstellt.
Vom tiefsten Punkt der Kurve fällt man nun das Lot auf die Sägezahnlinie und erhält so die den einzelnen Fraktionen entsprechenden Kurvenabschnitten. Darauf zählt man die Zacken der unteren Linie und errechnet so die Relativprozente der jeweiligen Fraktionen.
Aus den durch die Biuret- bzw. Kjeldahlmethode erhaltenen Gesamt-Protein-Konzentrationen in mg% kann man nun auch den absoluten Gehalt der einzelnen Fraktionen in mg% errechnen.

b) Statistik

Alle Meßwerte, die wir in unseren Untersuchungen erhielten, wurden auf Lochkarten übertragen.
Die vergleichbaren Untersuchungsreihen des normalen Collumgewebes und des Collum-Carcinomes wurden mit zwei statistischen Verfahren auf eindeutige Unterschiede untersucht; dabei wurden der "T-Test" zur Beurteilung von Durchschnitten und Streuung, sowie der " $X^2$-Test" zur Beurteilung von Häufigkeiten angewendet (WEBER, 1967 (109).
Die Signifikanz wird in beiden Verfahren ausgedrückt durch die Wahrscheinlichkeit (p), daß der Unterschied zwar eindeutig, aber nicht zufällig ist. Lag dieser p-Wert unter 0,05, so lag die Wahrscheinlichkeit, daß der Wert auf Zufall beruhte, unter 5%, und wir sprachen von Signifikanz.
Mit einer entsprechend programmierten IBM-Rechenmaschine wurde die Berechnung durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte im Rechenzentrum des Institutes für angewandte Mathematik (Direktor: Prof. Dr. J. Doerr) der Universität des Saarlandes.

B Untersuchungsergebnisse

a) Gesamtextrakte

Bei der Überprüfung der KCl-Gesamtextrakte in der Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese teilten wir die einzelnen Pherogramme zur statistischen Auswertung in 8 Fraktionen ein und verglichen die des normalen Collum, des Collum-Carcinomes und des Serums miteinander. Die Abb. 8 zeigt die graphische Auswertung schematisch.
In Abb. 9 und 10 sind die Superpositionsversuche dieser drei Lösungen abgebildet. Aus ihnen geht hervor, daß eine enge Beziehung zwischen der Wandergeschwindigkeit der Organ- und Serumproteine besteht.

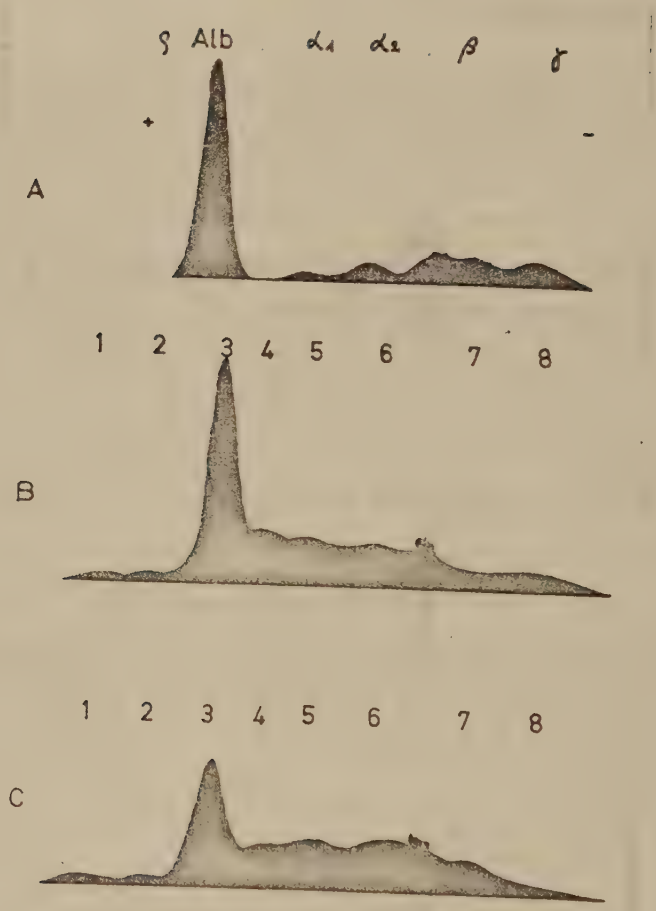



Abb. 8: Halbschematische Darstellung der Organ-Gesamt-Extrakte in der Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese.
A = Normalserum
B = Collum uteri
C = Collum-Carcinom

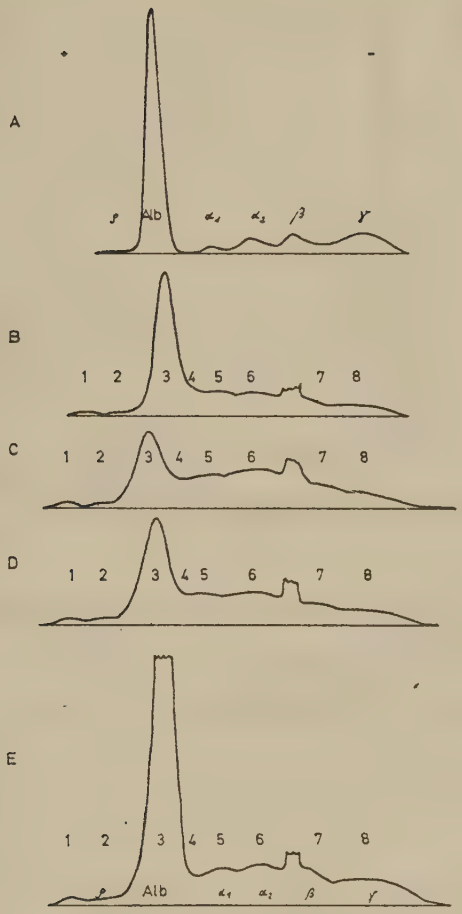



Abb. 9: Halbschematische Wiedergabe der Superpositionsversuche.
A = Normalserum
B = Collum uteri
C = Collum-Carcinom
D = Collum uteri und Collum-Carcinom
E = Collum uteri und Collum-Carcinom und Normalserum

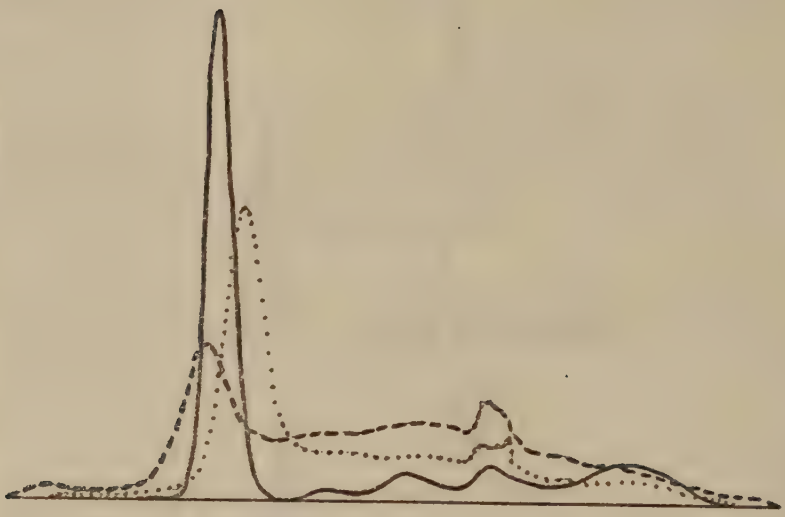


Abb. 10: Halbschematische Wiedergabe der Superpositionsversuche.

——— = Normalserum
..... = Collum uteri
------ = Collum-Carcinom

Die Tabelle 5 zeigt die Beziehungen zwischen Collum uteri und Collum-Carcinom, wie wir sie durch die statistische Auswertung erhielten. Dabei gingen wir von dem gemeinsamen Gesamteiweißgehalt der beiden Gewebe von 3411,5 mg% aus. Die beiden Vorfraktionen (1 und 2) waren bei der elektrophoretischen Auftrennung nicht regelmäßig anzutreffen. In der Statistik stimmen die Ergebnisse in rel.%-Angaben mit denen in mg% bis auf eine Ausnahme völlig überein. Die angewendeten statistischen Verfah-

| A) | Collum (n=29) | | Collum-Ca.(n=28) | | t-Test | $\chi^2$-Test |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Zone | M | ±s | M | ±s | (p-Wert) | (p-Wert) |
| 1 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 0,4 | <0,05 (s) | <0,005 s |
| 2 | 1,8 | 0,9 | 1,1 | 0,5 | <0,0005 ss | <0,005 s |
| 3 | 46,6 | 4,1 | 31,4 | 2,4 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 4 | 11,0 | 1,4 | 7,7 | 1,6 | ns | ns |
| 5 | 12,1 | 1,3 | 16,0 | 2,1 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 6 | 14,2 | 1,1 | 24,6 | 2,1 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 7 | 6,3 | 1,3 | 11,5 | 2,8 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 8 | 10,0 | 1,8 | 6,8 | 1,6 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| Alb./Glob. | 0,9 | 0,1 | 0,5 | 0,05 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| B) | (n=29) | | (n=28) | | | |
| 1 | 17 | 25 | 28 | 15 | <0,05 (s) | <0,005 s |
| 2 | 62 | 30 | 36 | 16 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 3 | 1591 | 141 | 1071 | 82 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 4 | 288 | 62 | 265 | 55 | ns | ns |
| 5 | 412 | 44 | 549 | 74 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 6 | 485 | 38 | 846 | 89 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 7 | 216 | 46 | 392 | 96 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |
| 8 | 341 | 62 | 233 | 55 | <0,0005 ss | <0,00025 ss |

Tab. 5: Statistische Auswertung der Organelektrophorese auf Celluloseazetatfolie

A = Werte in rel %  s= Streuung  ss = hochsignifikant
B = Werte in mg %  (s)=schwach signifikant  ns = kein eindeutiger Untersohied
M = Mittelwert  s= signifikant

ren brachten beide die gleichen Ergebnisse.
Beim Carcinom manifestiert sich eine Verminderung der dem Albumin entsprechenden Fraktion, während die den Globulinen entsprechenden Komponenten mit Ausnahme der Zonen 4 und 8 -die im Vergleich zum Normalgewebe tiefer liegen- erhöht sind. Die dem Albumin entsprechende Fraktion ist so deutlich erniedrigt, daß wir beim Carcinom-Gewebe einen Albumin/Globulin-Quotienten von nur 0,5 erhielten, während der des Normalgewebes 0,9 beträgt.

b) der Extrakte der Ultrazentrifugation

Die Abb. 11 bis 13 zeigen die in der Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese aufgetrennten Extrakte der Zellsubfraktionen. Dabei erhielten wir unterschiedliche Bilder, je nachdem ob die Lösungen unzentrifugiert, d. h. trüb oder zentrifugiert und klar aufgetragen wurden. Diese Differenz läßt sich durch den unterschiedlichen Eiweißgehalt je nach Lösung erklären, wie wir bereits in unseren Vorversuchen (Kap. III, A, 2) feststellen konnten.

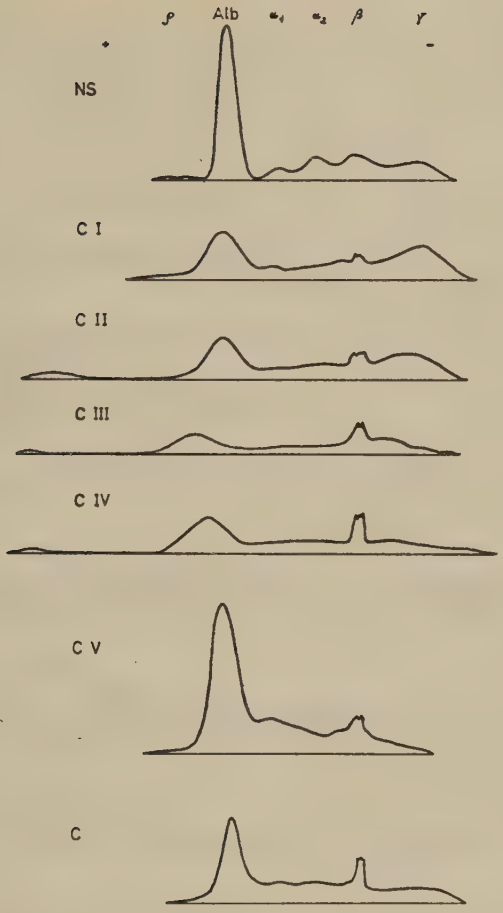



Abb. 11: Halbschematische Darstellung der Zellsubfraktionen des normalen Collum uteri; trübe Lösung aufgetragen.
NS = Normalserum
CI = 100 x g Sediment
CII = 600 x g Sediment
CIII = 10.000 x g Sediment
CIV = 240.000 x g Sediment
CV = Supernatant
C = Gesamtextrakt des Collum uteri

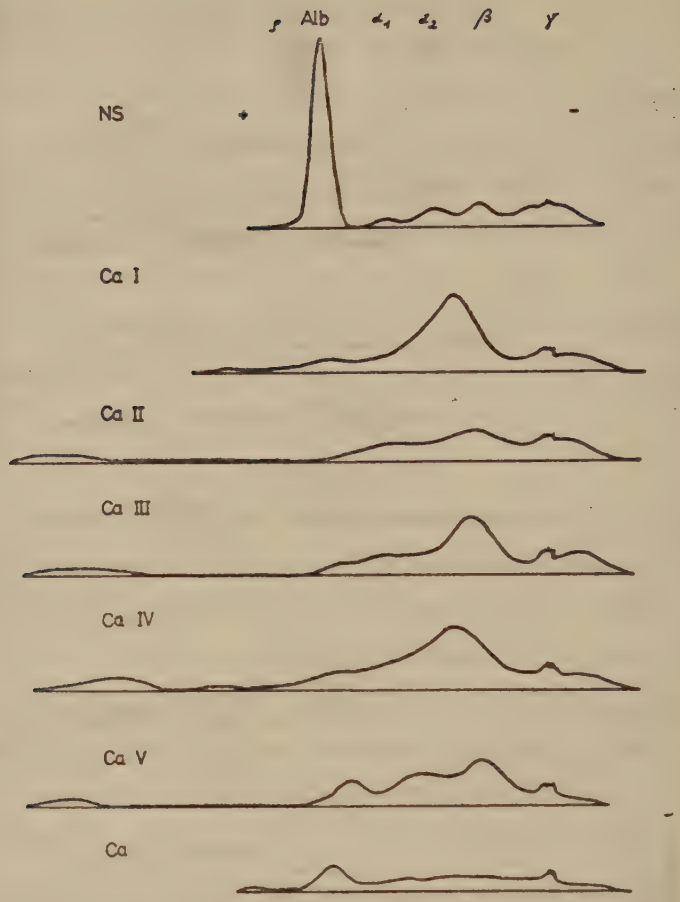



Abb. 12: Halbschematische Wiedergabe der Zellsubfraktionen des Collum-Carcinomes; trübe Lösung aufgetragen.
Bezeichnung wie Abb. 11
Ca = Gesamtextrakt des Collum-Carcinomes

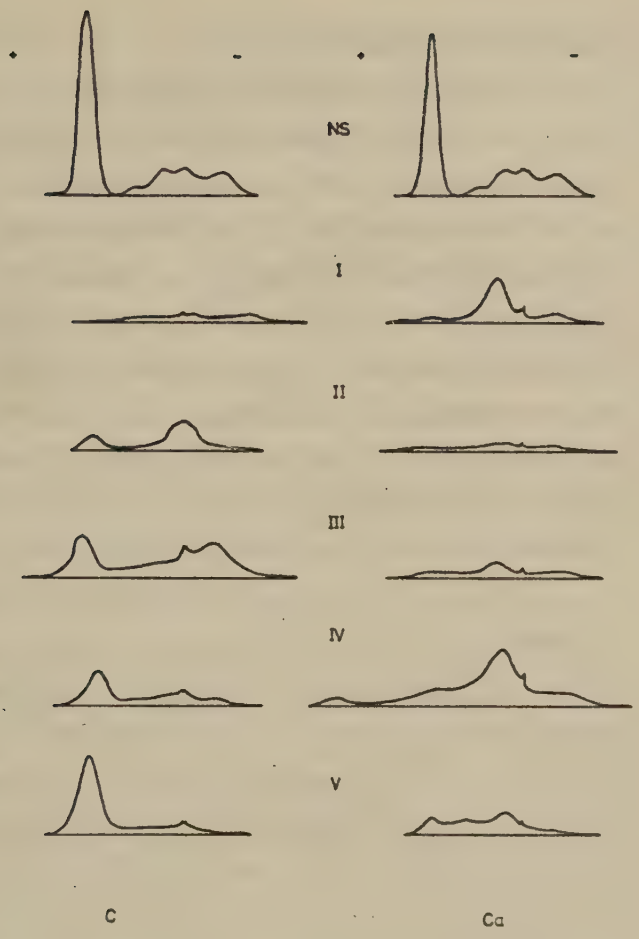



Abb. 13: Halbschematische Darstellung der Zellsubfraktionen im Vergleich normales Collum:Collum-Carcinom; klare Lösung aufgetragen.
links = C = Collum uteri
rechts = Ca = Collum-Carcinom
Bezeichnung wie Abb. 11 und 12

## IV. D I S K U S S I O N

Da die Aufarbeitung und Proteingewinnung von Gewebe auch heute noch recht problematisch ist und speziell für das Gewebe des Collum uteri fertig ausgearbeitete Methoden in der Literatur bisher fehlen, haben wir uns in erster Linie darum bemüht eine Methode zu finden, die es uns ermöglichen sollte die Proteine unter minimaler Schädigung möglichst vollständig zu extrahieren. Nach den zahlreichen vergleichenden Vorversuchen schien uns die hier angewandte Methode für unsere Fragestellung am geeignetesten, da bei unserer Homogenisation die Temperatur selbst nach 10 Minuten bis maximal 25 bis 30°C anstieg und -wie aus Tabelle 2 hervorgeht- die 0,14 M KCl-Lösung mit Abstand die höchste Proteinausbeute erbrachte. Die Lösung der lyophilisierten Extrakte in 0,9%iger NaCl-Lösung hätte uns durch allgemein schnellere Beweglichkeit der einzelnen Eiweißkomponenten deutlicher abgegrenzte Fraktionen erbracht. Da unsere Extrakte aber in späteren Arbeiten auch in der Agar-Elektrophorese (die eine elektrolytfreie Lösung erfordert) untersucht werden sollten, mußten wir unsere lyophilisierten Extrakte im Hauptuntersuchungsgang mit aqua bidest. auflösen.
Die größte Schwierigkeit dieser Arbeit jedoch lag in der geringen Menge an Carcinomgewebe, die uns dazu zwang, einen -für beide Organarten gültigen- Analysengang durchzuführen und in der Ultrazentrifugation gleichzeitig alle Zellsubfraktionen möglichst rein und unzerstört darzu-

stellen, was sich nach Angaben der Literatur (s. Kap. III, 3 d) kaum bewerkstelligen läßt. Aus diesem Grunde können wir auch nicht morphologisch definierte Fraktionen der beiden Gewebearten, sondern nur die Sedimente gleicher g-Zahl miteinander vergleichen. Auch möchten wir an dieser Stelle, wie bereits wiederholt in unseren Vorversuchen, feststellen, daß die Ergebnisse unserer Proteinanalyse aus Gewebe des Collum uteri wie des Collum-Carcinom nur auf der Basis der hier angewandten Methodik (besonders in Bezug auf Extraktion, Homogenisation und Auflösungsmedium der Organeiweiße) eine Aussagekraft haben und keinesfalls auf andere Methoden übertragen werden dürfen.

Bei unseren vergleichenden Untersuchungen des gesunden und carcinomatösen Gebärmutterhalses stellten wir eine Dysproteinose fest, die durch statistische Verfahren gesichert werden konnte. Beide Gewebearten zeigten in der Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese 8 Eiweißkomponenten, davon 2 schneller anodisch wandernde Vorfraktionen (1 und 2), die ihrer Lage nach der $\rho$-Fraktion des Serums entsprechen. Trotz signifikantem Unterschied in der Statistik kann ihnen jedoch beim Vergleich der beiden Organe kaum Bedeutung beigemessen werden, da sie nicht in allen Versuchen konstant anzutreffen waren.
Beim Carcinom konnten wir eine deutliche Abnahme der Fraktion 3 feststellen, die in ihrer Wandergeschwindig-

keit dem Albumin der Serumelektrophorese entspricht. Die Fraktion 4, die zwischen den Albumin-Globulin-Komponenten lag, brachte keinen eindeutigen Unterschied, während die den γ-Globulinen entsprechende Zone 8 beim Carcinom signifikant erniedrigt war. Die Fraktionen 5 bis 7, die mit dem α-, β- sowie schnellen Anteil des γ-Globulines der Serumelektrophorese vergleichbar sind, waren dagegen hochsignifikant vermehrt. Insgesamt resultiert daraus eine überaus deutliche Abnahme des Albumin/Globulin-Quotienten von 0,9 ± 0,1 des Normalgewebes auf 0,5 ± 0,005 des Carcinomgewebes.

Zu fast gleichen Ergebnissen kamen HÖHNE und KÜNKEL, 1954 (50). Sie fanden beim Eiweißdiagramm des Portiocarcinomextraktes eine Verminderung der dem Albumin entsprechenden Fraktion, eine allgemeine Erhöhung der den Globulinen korrespondierenden Zonen und einen Albumin/Globulin-Quotienten, der 0,4 nicht überstieg. Normales Collum-Gewebe haben die Autoren dabei nicht untersucht. DÖHLING, 1954 (26) dagegen fand in seinen papierelektrophoretischen Untersuchungen des Adenocarcinoms des Uterus eine relative Erhöhung des Albumingehaltes sowie der β- und γ-Globuline.
Ähnlichen Befund erhoben HENNING et al., 1953 (44). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Befunden kaum überein, sondern stehen sogar hinsichtlich des Albumingehaltes in offenem Gegensatz zu den von uns erhobenen Befunden. Sie lassen sich jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit durch die

unterschiedliche Aufarbeitung des Organes sowie die Anwendung der Papierelektrophorese erklären.

In Superpositionsversuchen, in denen Extrakte der beiden Gewebearten und des Serums teils einzeln teils zusammen aufgetragen wurden, konnten wir deutlich machen, wie eng die Zonen des Organpherogrammes an den Fraktionen der Serumelektrophorese liegen. So konnte auch LOSKANT, 1969 (68) bei gleicher Versuchsanordnung und Methodik mit Hilfe der Immunelektrophorese in den Pherogrammen des normalen Collum uteri 10 und in denen des Collum-Carcinomes 7 bis 8 serumidentische Proteinkomponenten feststellen, wobei dem Extrakt aus carcinomatösem Gewebe im Unterschied zu dem des normalen Collumgewebes das serumidentische Präalbumin und Coeruloplasmin völlig und das $\alpha_1$-Glykoprotein teilweise fehlten.
Andere elektrophoretische Untersuchungen speziell des Collum uteri und Collum-Carcinomes, an denen wir die in unseren Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse hätten überprüfen können, fanden wir in der Literatur nicht.
Da sich Organelektrophoresen je nach Extraktions- und Lösungsmittel stark ändern, wie wir selbst in unseren Voruntersuchungen zeigten, können wir aus unseren Versuchsergebnissen nicht schließen, daß beim carcinomatösen Collum uteri grundsätzlich qualitative Eiweißveränderungen vorliegen. Sie bestätigen ihrerseits wiederum, wie stark die gewonnenen Proteine von dem Extraktionsmedium sowie

vom pH-Wert und der Ionenstärke des Lösungsmittels abhängen.

Bei den elektrophoretischen Untersuchungen der klaren und trüben Extrakte der Sedimente aus den Zellsubfraktionen der Ultrazentrifuge konnten wir feststellen, daß sich die Erhöhung der Zonen 5 bis 7, die dem mittleren Globulinbereich der Serumelektrophorese entsprechen, beim Collum-Carcinom durch eine deutliche Verschiebung der Proteinkomponenten in den Zellsubfraktionen I, III und IV erklären lassen. Aus den licht- und elektronenmikroskopischen Überprüfungen können wir daher schließen, daß die Proteine, die in den Zonen 5 bis 7 enthalten sind, besonders reichlich im Bindegewebe, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Zellsaft des Carcinomgewebes enthalten sind.
Die signifikante Verminderung der Zone 3 in der Elektrophorese des carcinomatösen Collumgewebes können wir damit erklären, daß diese Komponente in allen subzellulären Fraktionen im Vergleich zu den korrespondierenden Zonen des Normalgewebes auffallend erniedrigt war.
Die hochsignifikante Verminderung der Zone 8 im Carcinom-Pherogramm läßt sich auf die deutliche Erniedrigung dieser Zone in den Fraktionen II, IV und V erklären, während sie in der Fraktion III des Normalextraktes am deutlichsten sichtbar wird. Die Zone 4 zeigte wie im Pherogramm der Gesamtextrakte auch in allen Subfraktionen des normalen wie carcinomatösen Collum uteri ein

unterschiedliches Verhalten.

Aus unseren elektrophoretischen Untersuchungen können wir folglich den Schluß ziehen, daß sich beim Collum-Carcinom im Vergleich zum normalen Collum uteri eine deutliche Verschiebung der Gewebeproteine ergibt, während die Frage der qualitativen Eiweißveränderung aufgrund unserer Versuche nicht beantwortet werden kann. Die Dysproteinose beruht jedoch nicht auf der Veränderung nur eines Zellelementes, sondern erfaßt die gesamte Zelle, wie aus unseren elektrophoretischen Untersuchungen der Zellsubfraktionen hervorgeht.

## V. Zusammenfassung

Nach einem Überblick über die beschriebenen Methoden zur Organaufarbeitung, der Löslichkeit der Proteine, ihre elektrophoretischen Untersuchungen sowie den bisherigen Untersuchungen der Uterusmuskulatur und der Ultrazentrifugation wurden in vergleichenden Vorversuchen das für unsere Zwecke günstigste Extraktionsmedium (0,14 M KCl-Lösung, pH = 5,9) ermittelt.

Darauf folgte die Beschreibung unserer Methodik der Gewebeaufarbeitung, Ultrazentrifugation und Zelluloseazetatfolien-Elektrophorese zur Untersuchung der Proteine des normalen Collum uteri sowie des Collum-Carcinomes.

Das Pherogramm beider Gewebearten zeigte in der Elektrophorese 8 Komponenten, wobei die dem Albumin entsprechende Fraktion beim Carcinom - trotz relativer Erhöhung ihrer Wandergeschwindigkeit nach den Globulinen zugehörigen Zonen - so deutlich erniedrigt war, daß ein Albumin/Globulin-Quotient von nur 0,5 $\pm$ 0,05 im Gegensatz zu 0,9 $\pm$ 0,1 beim normalen Collum resultierte.

Die elektrophoretischen Untersuchungen der Sedimente der Zellsubfraktionen bekräftigten diese Ergebnisse; die dem Globulinbereich der Serumelektrophorese entsprechenden Komponenten waren besonders in den Fraktionen I, III und IV der Ultrazentrifugation der Collum-Carcinom-Extrakte erhöht, während die dem Albumin zugehörige Zone in allen subzellulären Fraktionen auffallend vermindert war.

Aus unseren Untersuchungen können wir daher schließen,

daß sich beim Collum-Carcinom im Vergleich zum normalen Collum eine deutliche Verschiebung der Gewebeproteine = Dysproteine ergibt, die auf Veränderung der gesamten Zelle basiert.

## VI. Literaturverzeichnis


1. AFONSO, E.: Electrophoretic patterns of toumor tissue proteins. J. clin. Path. 16, (1963): 375-376

2. ALLEGRANZA, A. et MAROBBIO, C.: Electrophorèse en gélose des protéines hydrosolubles du cerveau du rat et du cerveau humain. Protides of the biological fluids 9, (1962): 241-243

3. AMBERSON, W. R., ERDÖS, T., CHINN, B. and LUDES, H.: Electrophoretic and ultracentrifugal analyses of protein extracted from whole mammalian muscles. J. biol. Chem. 181, (1949): 105-413

4. BACKHAUSZ, R.: Immundiffusion und Immunelektrophorese. Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena 1967

5. BAKAY, B. and SOROF, S.: Soluble nuclear proteins of liver and tumor in azo dye carcinogenesis. Cancer Res. 24, (1964): 1814-1822

6. BEHEIM, P. und JANN, W.: Isolierung von Zellkernen aus Normalgeweben und dem WALKER-Carcinom der Ratte. Materia Medica Nordmark XX, (1968): 618-621

7. BERENSON, G. S. and FISHKIN, A. F.: Isolation of a glycoprotein from bovine aorta. Arch. Biochem. and Biophys. 97, (1962): 18-20

8. BLASIUS, R. und SCHUCK, J.: Elektrophoretische Untersuchungen von Uterusmuskelproteinen infantiler und mit Östrogen behandelter infantiler Kaninchen. Klin. Wschr. 33, (1955): 276-278

9. BOMPIANI, A. e MALAGOLI, F.: Contributo allo studio della composizione proteica del miometrio umano. Clin. Ostet. Ginec. 82, (1960): 237-257

10. BONATTI, A., RAPP, W. et BURTIN, P.: Les anticorps antitumeurs gastriques humaines. Protides of the biological fluids 12, (1965): 219-221 Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York

11. BOSCH, M. W.: Quantitative electrophoretic study of rabbit muscle protein soluble in dilute salt solution. Biochim. biophys. Acta 7, (1951): 61-86

12. BRINTZINGER, H.: Dialyse, Elektrodialyse, Elektrodekantation und Diasolyse. in: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10. Aufl. II, (1955): 71-83, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg

13. CARROLL, P. M. and SEREDA, D. D.: Cell membran of uterine smooth muscle. Nature 217, (1968): 666-667

14. CARROLL, P. M. and SEREDA, D. D.: Sialic acid of uterine muscle membrane: reappraisal of the serotonin receptor of smooth muscle. Nature 217, (1968): 667-668

15. CIOFFI, L. A., di BENEDETTA, C. and SANTAMARIA, R.: Analysis of some protein fractions obtained from calf heart and skeletal muscle by pevikon block electrophoresis. Protides of the biological fluids 12, (1965): 258-261 Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York

16. CONSDEN, R. and KOHN, J.: Cellulose acetate as a medium for immunodiffusion. Nature 183, (1959): 1512

17. CREPAX, P., JAKOB, J. et SELDESLACHTS, J.: Contribution à l'étude des protéinogrammes électrophorétiques d'extraits de muscles contracturés. Biochim. biophys. Acta 4, (1950): 410-415

18. CREPAX, P.: Sur le rôle de l'ATP dans l'extractibilité des protéines musculaires. Biochim. biophys. Acta 7, (1951): 87-97

19. CRETIUS, K.: Zur molekularen Struktur des Bindegewebes im menschlichen Uterus. Arch. Gynäk. 202, (1965): 43-46

20. CRETIUS, K.: Weitere Studien über die Beschaffenheit des Uteruskollagens. Geburth. Frauenheilk. 26, (1966): 669-673

21. CRETIUS, K., HANNING, K. und BEIER, G.: Untersuchungen zur Löslichkeit und zum Verhalten des Kollagens im nichtschwangeren und im schwangeren menschlichen Uterus. Arch. Gynäk. 203, (1966): 329-353

22. CRETIUS, K. und JAISLE, F.: Untersuchungen zum Verhalten der Adenosintriphosphatase des menschlichen Uterusmuskels I. Mitteilung. Arch. Gynäk. 194, (1960): 266-276

23. CRETIUS, K. und JAISLE, F.: Untersuchungen zum Verhalten der Adenosintriphosphatase des menschlichen Uterusmuskels. III. Einfluß der Schwangerschaft auf die Enzymaktivität. Arch. Gynäk. 197, (1962): 140-148

24. DANESINO, V., FRANZA, C. e RICCARDI, I.: Le proteine contrattili dell' utero umano. Studio sulla distribuzione dell' actomiosina nell' utero non gravido. Arch. Ostet. Ginec. 63, (1958): 752-754

25. DEMLING, L.: Elektrophoretische Aufspaltung von Organeiweiß. Klin. Wschr. 30, (1952): 74

26. DEMLING, L.: Neoplasmen im Elektrophoresebild. Ärztl. Forsch. 8, (1954): 154-157

27. DEMLING, L. und ZACH, J.: Die Zelleiweißkörper der normalen und pathologischen Magenschleimhaut. Ärztl. Forsch. 9, (1955): 300-302

28. DOMAGK, G. F. und ZECH, R.: Die Nucleinsäuren in Theorie und Praxis. Hippokrates 39, (1968): 277-289

29. DUBRAUSZKY, V.: Wieviel Muskulatur enthält die Gebärmutter? Geburth. Frauenheilk. 22, (1962) 1022-1026

30. DUBRAUSZKY, V.: Weitere Beobachtungen zum Aufbau der Uteruswand in der Schwangerschaft. Arch. Gynäk. 202, (1965): 41-43

31. DUBUISSON, M. et JACOB, J.: Electrophorèse des protéines musculaires. Experientia 1, (1945): 272-274

32. EGGSTEIN, M. und KREUTZ, F. H.: Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Eiweißbestimmung im Liquor und eiweißarmen Lösungen. Klin. Wschr. 33, (1955): 879-884

33. EMMELOT, P., BOS, C. J., BENEDETTI, E. L. and RÜMKE, P.: Studies on plasma membranes. I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. biophys. Acta 90, (1964): 126-145

34. ERNST, K.: Papierelektrophoretische Untersuchungen von Muskelextrakten bei nutritiver Muskeldystrophie. Klin. Wschr. 45, (1967): 792-793

35. FREEMAN, K. B.: Protein synthesis in mitochondria. 4. Preparation and properties of mitochondria from Krebs II mouse ascites-tumor cells. Biochem. J. 94, (1965): 494-501

36. GIESEKING, R.: Neuere Aspekte der normalen und pathologischen Feinstruktur des Bindegewebes. Hippokrates 39, (1968): 437-446

37. GÖTZ, H. und SCHEIFFARTH, F.: Immunelektrophoretische Untersuchungen an Organextrakten. Klin. Wschr. 41, (1963): 87-89

38. GÖTZ, H., SCHEIFFARTH, F. und DÜBELER, I.: Vergleichende elektrophoretische und immunelektrophoretische Studien an Organextrakten des menschlichen Magens. Gastroenterologia 98, (1962): 30-47

39. GRAHAM, J. B. and GRAHAM, R. M.: Antibodies elicited by cancer in patients. Cancer 8, (1955): 409-416

40. GRUNDMANN, E., HILLEMANNS, H. G. und RHA, K.: Zur Zytogenese des Portiokarzinomes nach zytophotometrischen Untersuchungen. Verh. dtsch. Ges. Path. 44, (1960): 261-266

41. HAFERKAMP, O.: Immunobiologische und immunohistologische Untersuchungsmethoden an Leichenorganen und Leichenseren. Protides of biological fluids 12, (1965): 194-198 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York

42. HALLMANN, L.: Klinische Chemie und Mikroskopie. G. Thieme-Verlag, Stuttgart 10. Aufl. (1966): 639-641

43. HEINEN, G.: Immunelektrophoretische Studien am Uterusmuskel. Arch. Gynäk. 202, (1965): 500-504

44. HENNING, N., DEMLING, L. und KINZLMEIER, H.: Weitere Untersuchungen über die elektrophoretische Aufspaltung von Organproteinen. Klin. Wschr. 31, (1953): 435

45. HESSE, R.: Immuno-elektrophoretische Untersuchungen an Uterusmuskelextrakten. Med. Diss., Homburg/Saar 1965

46. HILLEMANNS, H. G.: Zur Entstehung des Plattenepithel-Karzinomes am Collum uteri. Klinisch-morphologische, cytometrische und immun-histologische Untersuchungen. Habil., Freiburg/Brsg. 1961

47. HITZIG, W. H.: Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin. Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg (1963): 21-23

48. HOGEBOOM, G. H. and SCHNEIDER, W. C.: Cytochemical studies of mammalian tissues. III. Isocitric dehydrogenase and triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of mouse liver. J. Biol. Chem. 186, (1950): 417-427

49. HOGEBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C. and PALLADE, G. E.: Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. biol. Chem. 172, (1948): 619-636

50. HÖHNE, G. und KÜNKEL, H. A.: Elektrophoretische Untersuchungen an Extrakten aus Tumorgeweben. Klin. Wschr. 32, (1954): 748

51. HOLLMANN, S. und RÖSICK, W.: Über die Löslichkeit der Uterusmuskelproteine. Pflügers Arch. ges. Physiol. 260, (1954): 161-169

52. JAEGER, J.: Zur Ultrastruktur des bindegewebigen Anteils der Uterusmuskulatur. Arch. Gynäk. 202, (1965): 59-62

53. JAISLE, F.: Tropomyosin in der menschlichen Uterusmuskulatur. Arch. Gynäk. 194, (1960): 277-286

54. JAISLE, F.: Tropomyosin im Myomgewebe. Gynaecologia 153, (1962): 19-24

55. JAISLE, F.: Die Isolierung der contraktilen und Strukturproteine aus dem Myometrium beim Menschen. Arch. Gynäk. 200, (1964/65): 421-427

56. JAISLE, F. und CRETIUS, K.: Untersuchungen zum Verhalten der Adenosintriphosphatase des menschlichen Uterusmuskels. II. Mitteilung: Enzymaktivität nach Fraktionierung der Muskelextrakte in der Ultrazentrifuge. Arch. Gynäk. 196, (1961): 266-276

57. JAKOB, J. J. C.: The electrophoretic analysis of protein extracts from striated rabbit muscle. Biochem. J. 41, (1947): 83-94

58. JUNGBLUT, P. W.: Biosynthese von Rattenserumalbuminen. I. Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Albuminen aus Zellelementen der Rattenleber. Biochem. Z. 337, (1963): 266-284

59. KAO, K. Y. T., HITT, W. E., DAWSON, R. L. and Mc. GAVACK, T. H.: Connective tissue. XIV. Preparation and amino acid composition of soluble collagen from human uterus. Arch. Biochem. 120, (1967): 518-52

60. KAPLAN, M. H. and MEYESERIAN, M.: Immunologic studies of heart tissue. V. Antigens related to heart tissue revealed by cross reaction of rabbit antisera to heterologous heart. J. Immunolog. 88, (1962): 450

61. KESSEL, M.: Versuche zur Organ-Immunelektrophorese. Protides of the biological fluids 7, (1960): 55-60 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York

62. von KLEIST, S. and BURTIN, P.: On the specifity of autoantibodies present in colon cancer patients. Immunology 10, (1966): 507-515

63. KOHN, J.: Small-scale membrane filter electrophoresis and immuno-electrophoresis. Clin. chim. Acta 3, (1958): 450

64. LANG, K. und SIEBERT, G.: Untersuchungen über Stoffwechselprozesse in isolierten Zellkernen. 6. Mitteilung: Methodik der Gewinnung reiner intakter Zellkerne in beliebigem Maßstab. Biochem. Z. 322, (1952): 360-367

65. LANG, K. und SIEBERT, G.: Aufarbeitung von Geweben und Zellen. in: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Band II 530-580, 10. Auflage Springer-Verlag Göttingen, Heidelberg (1955)

66. LOHMANN, D.: Über die löslichen Proteine der Gefäßintima. Protides of the biological fluids 10, (1963): 61-63 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York

67. van de LOO, J.: Vergleichende Untersuchungen über neuere Proteinbestimmungsmethoden. Protides of the biological fluids 10, (1963): 335-338 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York

68. LOSKANT, G.: Untersuchungen zur Immunologie und Proteinstruktur des Carcinoma Colli Uteri. Habil., Homburg-Saar (1969)

69. LOWENTHAL, A., van SANDE, M., KARCHER, D. and RICHARD, J.: Proteins and enzymes of the nervous system in different species. in: Comparative Neurochemistry Pergamon Press Oxford, London, New York, Paris. Symposion Publications Divisions (1964)

70. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, (1951): 265-275

71. LUNDKVIST, U., PERLMANN, P. and GOERINGER, G. C.: Antigens in microsomes and other subcellular fractions of parenchymal and "Reticuloendothelial cells" of rat liver: fluorescent antibody staining! Protides of the biological fluids 12, (1965): 236-241 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York

72. Mac KENZIE, A. P. and LUYET, B. J.: Freeze drying and protein denaturation in muscle tissue; losses in protein solubility. Nature 215, (1967): 83-84

73. MEIENHOFER, J. und ZAHN, H.: Gewinnung und Reindarstellung von Proteinen. in: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Vol. IV/1 (1960): 1-115 Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg

74. MELVIN, H., KAPLAN, M. H. and MEYESERIAN, M.: Immunologic studies of heart tissue: V. Antigens related to heart tissue revealed by cross reaction of rabbit-antisera to heterologous heart. J. Immunol. 88, (1962): 450-461

75. MILLER, G. L., GREEN, E. U., MILLER, E. E. and KOLB, J. J.: Studies on the proteins of rhabdomyosarcoma and normal muscle of mice. II. Electrophoretic and viscometric measurements. Cancer Res. 10, (1950): 149-154

76. MOORE, B. W. and Mc. GREGOR, D.: Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. J. biol. Chem. 240, (1965): 1647-1653

77. NAESLUND, J. und SNELLMANN, O.: Untersuchungen über die Kontraktilität im Corpus, Isthmus und in der Cervix uteri unter normalen Verhältnissen und während der Schwangerschaft und Entbindung. Arch. Gynäk. 180, (1951): 137-142

78. NEEDHAM, D. M. and WILLIAMS, J. M.: The proteins of the dilution precipitate obtained from salt extracts of pregnant and non-pregnant uterus. Biochem. J. 89, (1963): 534-545

79. NIKILLA, O. E. and LINKO, R. R.: Paper-electrophoretic analysis of proteins extracted at low ionic strength from fish skeletal muscle. Biochem. J. 60, (1955): 242-247

80. OESTERLE, W.: Über den Stoffwechsel des 3-Acetylpyridin in vitro. Med. Diss., Freie Universität Berlin (1966)

81. OTT, H., LOHSE, F. und GERGELY, J.: Der Nachweis von Serumlipoproteiden in der Aortenintima. Klin. Wschr. 36, (1958): 383-384

82. PERLMANN, P. and d'AMELIO, V.: Soluble antigens in microsomes and other cellfractions of rat liver. Nature 181, (1958): 491-492

83. PERLMANN, P., GOERINGER, G. C. and LUNDKVIST, U.: Antigens in microsomes and other subcellular fractions of parenchymal and "reticuloendothelial cells" of rat liver. Agar diffusions studies. Protides of the biological fluids 12, (1965): 232-235 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York

84. PLASS, R. und SCHWENKE, K. D.: Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen von Isoenzymmustern in Extrakten aus Tumor- und Normalgewebe sowie im Serum des Goldhamsters. Arch. Geschwulstforsch. 28, (1966): 328-340

85. RAPP, W., ARONSON, S. G., KUSHNER, I., BURTIN, P. et GRABAR, P.: Les antigènes de la muqueuse gastrique cancéreuse humaine. in: Immunopathology, IV$^{th}$ international Symposium February 1965, Monte Carlo, 77-90 Schwabe & Co. Publ. Basel-Stuttgart

86. RAPP, W. et BURTIN, P.: Distribution des constituanes et antigenes de la muqueuse gastrique humaine dans les fractions subcellulaires. Protides of the biological fluids 12, (1965): 213-215 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York

87. REINHARDT, F. und SCHÜLLER, E.: Immunelektrophorese des Endometriums. Arch. Gynäk. 197, (1963): 601-604

88. ROBERT, L., PARLEBAS, J., POULAIN, N. et ROBERT, B.:
Données nouvelles sur l'immunchimie des protéines fibreuses du tissu conjonctif.
Protides of the biological fluids 11, (1964): 109-113
Elsevier Publishing Company
Amsterdam, London, New York

89. ROODYN, D. B., FREEMAN, K. B. and TATA, J. R.:
The stimulation by treatment in vivo with tri-iodothyronine of amino acid incorporation into protein by isolated rat liver mitochondria.
Biochem. J. 94, (1965): 628-641

90. RÜMKE, Ph.:
Anticytoplasmic auto-antibodies in a patient with signs of tumour resistance.
Europ. J. Cancer 1, (1965): 321-325

91. van SANDE, M., van CAMP, K. et DENIS, L.:
Diagnostic du cancer de la prostate par micro-électrophorèse en gel de gelose.
Protides of the biological fluids 7, (1960): 339-342
Elsevier Publishing Company
Amsterdam, London, New York

92. SANDRITTER, W. und FISCHER, R.:
Der DNS-Gehalt des normalen Plattenepithels, des Carcinoma in situ und des invasiven Carcinoms der Portio.
in: Process of the International Congress of Exfoliative Cytology, Wien (1961)

93. SCHMETKAMP, P.: Elektrophoretische Untersuchungen über Gewebseiweiße.
Med. Diss., Bonn (1954)

94. SCHNEIDER, W. C.: Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fractions.
J. biol. Chem. 176, (1948): 259-266

95. SCHNEIDER, W. C. and HOGEBOOM, G. H.: Cytochemical studies of mammalian tissues: the isolation of cell components by differential centrifugation: a review.
Cancer Res. 11, (1951): 1-22

96. SCHWALM, H. und CRETIUS, K.: Über den Gehalt der menschlichen Uterusmuskulatur an contractilen Proteinen, an wasserlöslichen Proteinen und an Stromaeiweiß.
Arch. Gynäk. 191, (1958): 271-282

97. SCHWENKE, K. D.: Vergleichende Untersuchungen löslicher Organproteine aus Tumor- und Normalgeweben mit Hilfe der freien Elektrophorese.
Z. Krebsforsch. 68, (1966): 112-11

98. SCHWENKE, K. D. und PLASS, R.: Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen von Serumproteinen und löslichen Leberproteinen aus normalen und tumortragenden Goldhamstern.
Z. Krebsforsch. 69, (1967): 205-21

99. SHULMAN, S., LANG, R., BEUTNER, E. and WITEBSKY, E.: Precipitation of autoantibody in serum from patients with Myasthenia gravis. Immunology 10, (1966): 289-303

100. SIEBERT, G.: Fraktionierung tierischer Gewebe in wäßrigen Medien. in: RAUEN, H. M. "Biochemisches Taschenbuch Springer-Verlag Berlin, Göttingen,Heidelberg (1956): 904-910

101. SIEBERT, G.: Isolation of nuclei. in: BUSCH, H.: Methods in cancer research II, (1967): 287 Academic Press, New York, London

102. SOBER, H. A., HARTLEY, R. W., CARROLL, W. R. and PETERSON, E. A.: Fractionation of proteins. in: NEURATH, H.: The proteins III, (1965): 2-98 Academic Press, New York, Londo

103. SZÉCSEY, G., DOBIÁS und VÉGH, M.: Über die Wirkung eines Immunserums gegen Rattenlebermitochondrien auf den Sauerstoffverbrauch von Lebermitochondrien und einiger Gewebe von Ratten. Z. Immun. Forsch. 131, (1966): 390-396

104. TENG, Ch. S. and HAMILTON, T. H.: Regulation of polyribosome formation and protein sythesis in the uterus. Biochem. J. 105, (1967): 1091-1109

105. THEMANN, H.: Ultrastruktur und Funktion der Zelle. Hippokrates 39, (1968): 1-5

106. THOMPSON, T. E. and Mc. LEES, B. D.: An electrophoretic study of suspensions of intact mitochondria and fragments of mitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta 50, (1961): 213-223

107. WÄCHTER, R.: Elektrophoretische Untersuchung über Gewebseiweiß aus gynäkolog schem Operationsmaterial. Med. Diss., Bonn (1957)

108. WEBB, T. E., BLOBEL, G. and POTTER, V. R.: Polyribosomes in rat tissues. I. A study of in vivo patterns in liver and hepatomas. Cancer Res. 24, (1964): 1229-12

109. WEBER, E.: Grundrisse der biologischen Statistik. Fischer-Verlag, Stuttgart (1967

110. WUHRMANN, F. und WUNDERLY, Ch.: Die Bluteiweißkörper des Menschen. Schwabe & Co.-Verlag, Basel (1957)

111. ZINOVIEVA, I. P.: Contractile proteins of the uterus. Akus. i. Ginek. 35, (1959): 45-

Herrn Prof. Dr. med. H. Limburg, dem Direktor der Universitäts-Frauenklinik Homburg/Saar danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Priv. Doz. Dr. G. Loskant möchte ich meinen aufrichtigen Dank für die freundliche Hilfe bei der Ausführung und Gestaltung der vorliegenden Arbeit aussprechen.

Lebenslauf

Am 9. Oktober 1943 wurde ich als Sohn der Eheleute Ernst Austgen und dessen Ehefrau Elfriede geb. Blazek in Liegnitz/Schlesien geboren. Von 1949 bis 1954 besuchte ich die Volksschulen in Merzig und Losheim/Saar. Anschließend besuchte ich das staatliche Ludwigsgymnasium in Saarbrücken, an dem ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität des Saarlandes. Im Herbst 1964 legte ich das Vorphysikum, im Sommer 1966 das Physikum und im Dezember 1969 das medizinische Staatsexamen ab. Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich am Kreiskrankenhaus Ottweiler und in der II. Med. Klinik und Poliklinik der Universität des Saarlandes tätig.

Seit dem 15. 9. 1970 arbeite ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter an dem Institut für Biophysik und Nuclearmedizin der Universität des Saarlandes.